



THESE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Paul Sabatier de Toulouse

Discipline ou spécialité : *Sciences des Agroressources*

Présentée et soutenue par Sabina Bassil

Le 17 septembre 2015

Titre :

Etude de la répartition structurale des acides férulique et *p*-coumarique dans la chènevotte
et la poudre organique de chanvre (*Cannabis sativa*)
Exploration des voies de fractionnement pour l'obtention d'extraits à valeur ajoutée

Ecole doctorale :

Sciences de la matière

Unité de recherche :

Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle, UMR 1010 – INPT ENSIACET

Directeurs de Thèse :

Mme Christine RAYNAUD – Ingénieur de recherche – LCA/CATAR – ENSIACET – INP Toulouse
Mme Valérie SIMON – Maître de conférences – LCA – ENSIACET – INP Toulouse

Rapporteurs :

Mme Anne-Sylvie FABIANO-TIXIER – Maître de conférences – Université d'Avignon et des Pays du
Vaucluse
M. Komla SANDA – Professeur – Université de Lomé – Togo

Membres du jury :

Mme Laure CANDY – Ingénieur de recherche – LCA/CATAR – ENSIACET – INP Toulouse
Mme Angélique MASSERON – Professeur – Université de Haute Alsace – Mulhouse Colmar
M. Dominique DE CARO – Professeur – Université Paul Sabatier – Toulouse
M. Chaker EL KALAMOUNI – Maître de conférences – Université de la Réunion

Membres invités :

M. Luc RIGAL – Ingénieur de recherche – LCA – ENSIACET – INP Toulouse
Mme Christine RAYNAUD – Ingénieur de recherche – LCA/CATAR – ENSIACET – INP Toulouse
Mme Valérie SIMON – Maître de conférences – LCA – ENSIACET – INP Toulouse

À la mémoire de ma très chère maman

À ma famille

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'école doctorale Sciences de la matière qui m'a proposé une bourse ministérielle et qui est intervenue pour le bon déroulement des trois années de thèse. Je tiens aussi à remercier le directeur du Laboratoire de Chimie Agro-industrielle LCA, M. Carlos VACA-GARCIA, qui m'a accueilli au sein de son laboratoire pour réaliser mes travaux de recherche.

Je remercie également l'ensemble des membres de mon jury de thèse qui ont accepté d'évaluer mon travail : Mme Anne-Sylvie FABIANO-TIXIER, Maître de conférences à l'Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse et M. Komla SANDA, Professeur à l'Université de Lomé, Togo d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail et pour leurs remarques et observations qui m'ont aidée à améliorer la qualité de mon manuscrit ; M. Dominique DE CARO, Professeur à l'Université Paul Sabatier d'avoir accepté de présider mon jury de thèse ; Mme Angélique MASSERON, Professeur à l'Université de Haute Alsace, Mulhouse Colmar ; M. Chaker El KALAMOUNI, Maître de conférences à l'Université de la Réunion et M. Luc RIGAL, Ingénieur de recherche au LCA, d'avoir accepté notre invitation pour participer au jury de thèse.

Je tiens ensuite à remercier ma directrice de thèse, Christine RAYNAUD, qui a dirigé ce travail et ma codirectrice de thèse, Valérie SIMON, pour les informations échangées surtout sur la partie analytique, et Laure CANDY surtout pour le temps précieux qu'elle m'a accordé tout au long de ces années et toutes les connaissances qu'elle m'a transmis. Merci pour m'avoir fait partager ses compétences et ses conseils avisés.

Merci également à Anne pour l'aide apportée au niveau des manips et du matériel de laboratoire, à William, à Vincent pour l'aide technique et à mes stagiaires Alexandre et Simon. Ils ont tous contribué à la réalisation de cette thèse.

Du côté enseignement, je tiens à remercier le directeur du département de chimie de la Faculté des Sciences et d'Ingénierie (FSI) de l'université Paul Sabatier, M. Pierre SUTRA, et l'équipe S2 Rebondir surtout Jérôme Cuny (MCF), Stéphanie Cassel (MCF), Isabelle

Hallery (PRAG), Anne-Marie Galibert (MCF), et Clara Fournier-Noël (MCF) qui m'ont aidée à accomplir mon travail.

Un grand merci à tous les thésards du LCA et en particulier mes collègues et amis : Assad, Cécile, Gildas, Hussein, Djibril, Natalia, Benjamin, Lonn, Evelinne, Alice, Hien et Bastien pour les beaux moments passés ensemble, la bonne humeur et le soutien ; mes collègues de bureau : JB, Zaher, Pablo, Winda, Manon et Clément pour la belle ambiance et les discussions de tous les jours ; et les libanais que j'ai rencontrés à Toulouse : Hicham, Joelle, Anthony, Bernard, Bendy, Marguerite, Jad, Céline et Gaby avec qui j'ai passé des moments inoubliables.

Enfin, mes remerciements sont plus particulièrement adressés à mes parents, au Liban, pour leur soutien et leur compréhension durant ces trois années de travail acharné ; aucun mot ne suffira pour leur exprimer ma gratitude. Je remercie spécialement ma sœur Siréna, en France, sans qui je n'aurais pas su dépasser les moments difficiles. Merci pour ton soutien moral, tes encouragements, ton aide à tout moment et pour les agréables instants partagés lors des voyages à travers l'Europe ; ma sœur jumelle Sarita, aux Etats-Unis, qui me manque énormément et qui ne cessait pas de m'encourager. Mon frère Rodolph, au Liban, qui est toujours présent pour toute aide et auprès de qui je n'ai pas pu être pendant les moments les plus difficiles qu'il a vécus.

A la mémoire de ma mère Saïdé qui nous a quittés si soudainement deux semaines après ma soutenance, je dédie cette thèse de doctorat.

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS	vii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES TABLEAUX	xv
INTRODUCTION	1

CHAPITRE I : LE CHANVRE (*CANNABIS SATIVA*) SOURCE DE COMPOSES A HAUTE VALEUR AJOUTEE

I. 1. Le chanvre et ses coproduits : état de connaissance	10
I.1.1. Description générale de la plante.....	14
<i>a. Caractéristiques botaniques et physiologiques de la plante.....</i>	<i>14</i>
<i>b. Culture du chanvre.....</i>	<i>21</i>
I.1.2. Utilisation du chanvre et de ses coproduits en Europe et en France	22
I.1.2.1. La graine de chanvre ou chènevis.....	23
I.1.2.2. Les fibres	25
<i>a. Procédés de défibrage.....</i>	<i>26</i>
<i>b. Utilisation de la fibre.....</i>	<i>27</i>
<i>c. Coproduits.....</i>	<i>29</i>
I.1.3. Les coproduits du chanvre : une source potentielle de composés bioactifs	31
I.1.3.1. Localisation et structure chimique des principaux constituants.....	31
<i>I.1.3.1.1. Cellulose et hémicelluloses.....</i>	<i>32</i>
<i>I.1.3.1.2. Lignine</i>	<i>33</i>
I.1.3.2. Acides phénoliques	38
I.1.3.3. Autres constituants pariétaux	44
I. 2. Extraction des acides férulique et coumarique	46
I.2.1. Principes généraux de l'extraction de la matière végétale	46
I.2.2. Méthodes d'extraction des acides férulique et coumarique	49
I.2.3. Technologies potentielles applicables à l'extraction des acides férulique et coumarique	62
I.2.3.1. Micro-ondes.....	62
I.2.3.2. Extrusion Bi-vis.....	65
I. 3. Analyse des acides férulique et coumarique	68

I. 4. Concentration et purification des extraits	74
I.4.1. Séparation membranaire.....	74
I.4.2. Adsorption	75
<i>I.4.2.1. Généralités.....</i>	<i>75</i>
<i>I.4.2.2. Les zéolithes.....</i>	<i>78</i>
I. 5. Conclusion	82
I. 6. Références	84

CHAPITRE II : CARACTERISATION DE DEUX COPRODUITS DE LA FILIERE CHANVRE ET DETERMINATION DE LEUR POTENTIEL EN ACIDES HYDROXYCINNAMIQUES

II.1. Répartition des principaux constituants des coproduits	107
II.1.1. La chènevotte ou copeaux de chanvre	107
II.1.1.1. Caractéristiques générales : origine et description	107
II.1.1.2. Caractérisations physique et microscopique	108
<i>II.1.1.2.1. Caractérisation physique</i>	<i>108</i>
<i>II.1.1.2.2. Caractérisation des parois végétales par des approches en microscopie</i>	<i>110</i>
<i>a. Mise en évidence des structures tissulaires</i>	<i>111</i>
<i>b. Mise en évidence des composés lignifiés</i>	<i>111</i>
<i>c. Mise en évidence des composés aromatiques par autofluorescence</i>	<i>112</i>
II.1.1.3. Analyse quantitative des constituants de la chènevotte	117
<i>a. Composition de la matière minérale</i>	<i>117</i>
<i>b. Cellulose, Hémicelluloses, lignines</i>	<i>118</i>
<i>c. Les composants minoritaires</i>	<i>121</i>
II.1.1.4. Extraction et analyse de la fraction phénolique	122
II.1.2. La poudre organique	127
II.1.2.1. Caractéristiques générales : origine et description	127
II.1.2.2. Caractérisation physique, observation microscopique, évaluation des facteurs de formes	128
II.1.2.3. Analyse quantitative des constituants de la poudre organique	131
<i>a. Composition de la matière minérale</i>	<i>131</i>
<i>b. Cellulose, hémicelluloses, lignines</i>	<i>131</i>

<i>c. Les composants minoritaires</i>	132
II.1.2.4. Extraction et analyse de la fraction phénolique	133
II.2. Extraction des acides hydroxycinnamiques des coproduits du chanvre	136
II.2.1. La chènevotte	138
II.2.1.1. Extraction analytique sans hydrolyse chimique	138
II.2.1.2. Hydrolyse alcaline en batch	142
II.2.2. La poudre organique	145
II.2.2.1. Extractions analytiques sans hydrolyse chimique	145
II.2.2.2. Hydrolyse alcaline	148
II.3. Caractérisation des liaisons éther/ester dans les coproduits lignocellulosiques du chanvre	151
II.3.1. Présentation de la technique d'extraction séquencée	154
II.3.2. Application à la chènevotte	158
II.3.3. Application à la poudre organique	163
II.3.4. Conclusions sur l'extraction séquencée	167
II.4. Conclusion	168
II.5. Références bibliographiques	171

CHAPITRE III : FRACTIONNEMENT DE DEUX COPRODUITS DU CHANVRE POUR L'OBTENTION D'ACIDES HYDROXYCINNAMIQUES

III. 1. Etude de l'extraction des acides phénoliques des coproduits du chanvre en extrudeur bi- vis type BC21	179
III.1.1. La chènevotte	185
III.1.1.1. Faisabilité de l'extraction liquide/solide en extraction par extrusion bi-vis	185
III.1.1.2. Influence du solvant et de la température sur l'extraction des composés phénoliques	192
III.1.1.3. Caractérisation physico-chimique des extrudats.....	200
III.1.2. La poudre organique	206
III.1.2.1. Faisabilité de l'extraction liquide/solide en extraction par extrusion bi-vis	206
III.1.2.2. Influence du solvant et de la température sur l'extraction des composés phénoliques	212
III.1.2.3. Caractérisation physico-chimique des extrudats	217
III. 2. Fractionnement par extraction assistée par micro-ondes	222

III.2.1. Influence du solvant et de la température sur l'extraction des composés phénoliques : cas de la chènevotte.....	222
III.2.2. Influence du solvant et de la température sur l'extraction des composés phénoliques : cas de la poudre organique.....	228
III. 3. Comparaison des technologies d'extraction des composés phénoliques.....	232
III.3.1. La chènevotte	232
III.3.2. La poudre organique	234
III.3.3. Vers un procédé industriel pour l'extraction des acides phénoliques	236
III. 4. Conclusion	239
III. 5. Références.....	242

CHAPITRE IV : CONCENTRATION DES EXTRAITS VIA L'UTILISATION DE ZEOLITHES

IV.1 Résumé	247
IV.2 Recovery of hydroxycinnamic acids from renewable resources by adsorption on zeolites.....	248
IV.3 Conclusion	261

CONCLUSION ET PERSPECTIVES265

MATERIEL ET METHODES

1. Origine, conditionnement et caractérisation des coproduits du chanvre	273
1.1. Origine des matières premières.....	273
1.2. Prétraitement de la matière première	273
Les matières premières utilisées dans cette étude n'ont subi aucune étape de séchage. ..	273
1.3. Caractérisation physique de la matière première	274
a. Observation sous loupe binoculaire	274
b. Caractérisations des parois végétales par des approches en microscopie	274
c. Distribution granulométrique	276
d. Densité tapée	276
1.4. Caractérisation chimique de la matière première	277
a. Détermination des matières sèches, minérales et organiques	277
b. Dosage des minéraux	278

<i>c. Détermination de la proportion en constituants pariétaux : cellulose, hémicelluloses et lignine</i>	279
<i>d. Dosage des protéines</i>	281
<i>e. Dosage des pectines</i>	282
<i>f. Dosage des lipides</i>	283
1.5. Détermination du potentiel en composés extractibles	284
1.6. Extraction séquencée : caractérisation des liaisons éther et ester dans les coproduits du chanvre	285
<i>a. Etape I : Décirage et extraction des composés phénoliques libres</i>	287
<i>b. Etape II : Acide férulique et acide p-coumarique estérifiés et les phénols associés (hydrolyse alcaline)</i>	287
<i>c. Etape III : Acide férulique et acide p-coumarique étherifiés (hydrolyse acide)</i>	288
2. Fractionnement des coproduits du chanvre	289
2.1. Macération ou extraction en batch	289
2.2. Extractions Soxhlet	290
2.3. Extraction accélérée par solvant ASE	290
<i>a. Essais préliminaires</i>	291
<i>b. Préparation des échantillons</i>	292
<i>c. Fonctionnement de l'ASE</i>	292
2.4. Hydrolyse alcaline en batch	294
<i>a. Etude préliminaire</i>	294
<i>b. Protocole expérimental retenu</i>	296
2.5. Extraction en extrudeur bi-vis BC21	296
<i>a. Présentation de l'extrudeur BC21</i>	296
<i>b. Equipements périphériques</i>	297
<i>c. Configuration du profil de vis</i>	297
<i>d. Post traitement des filtrats</i>	299
<i>e. Post traitement des extrudats</i>	300
2.6. Extraction assistée par micro-ondes	300
<i>a. Remarques sur la faisabilité de l'extraction liquide/solide en réacteurs micro-ondes</i>	300
<i>b. Conditions opératoires d'extraction en réacteur micro-ondes</i>	301
<i>c. Post-traitement des échantillons</i>	302

3.	Méthodes d'analyse	302
3.1.	Dosage des polyphénols totaux contenus dans un extrait	302
3.2.	Dosage des acides phénoliques par chromatographie en phase liquide à haute performance	304
4.	Concentration des extraits	308
<i>a.</i>	<i>Préparation des adsorbants</i>	<i>309</i>
<i>b.</i>	<i>Etape d'adsorption</i>	<i>309</i>
<i>c.</i>	<i>Etape de désorption</i>	<i>309</i>
<i>d.</i>	<i>Etape de régénération</i>	<i>309</i>
5.	Références bibliographiques	310
ANNEXES		311

Liste des abréviations

AF : Acide Férulique

AP : Acides Phénoliques

ApC : Acide *p*-Coumarique

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CH : Chènevotte

CTAB : *CetylTrimethylAmmonium Bromide*

DAD : détecteur à barrette de diodes

EAG : Equivalent Acide Gallique

EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétatique

EIHA : *European Industrial Hemp Association*

EtOH : Ethanol

HPTLC : *High Performance Thin Layer Chromatography*

LCC : complexe lignine-hémicelluloses ou *Lignines Carbohydrates Complexes*

L/S : Liquide/Solide

MAE : *Microwave Assisted Extraction* ou Extraction Assistée par Micro-ondes

MM : Matière Minérale

MO: Matière Organique

MO_E : Matière Organique Extraite

MO_i : Matière Organique initiale contenue dans la matière végétale

MS : Matière Sèche

MS_E : Matière Sèche Extraite

MS_i : Matière Sèche initiale contenue dans la matière végétale

Nd : Non déterminé

n.d. : non détecté

P : Poudre organique

PDA : détecteur à barrette de photodiodes

PP : Composés phénoliques totaux ou polyphénols totaux

REACH : *Registration, Evaluation, Authorization and restriction of Chemicals* ou en français enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des substances chimiques

SAA : Spectrophotométrie d'Absorption Atomique

THC : Tétrahydrocannabinol

TMC : Thermo-Mécano-Chimique

tpm ou en anglais *rpm* : tours par minute ou en anglais *rotation per minute*

UV : Ultraviolet

Van : Vanilline

%NaOH/MO_i : Pourcentage de soude calculé par rapport à la matière organique initiale contenue dans la matière végétale

Liste des figures

Figure I.1 : Planche botanique du chanvre- <i>Cannabis sativa</i> L. par (Köhler 1897)	9
Figure I.2 : Récolte et travail du chanvre en 1695 (Du Bos d'Elbhecq et Faudet 1862)	10
Figure I.3 : Les surfaces en chanvre dans les exploitations agricoles en 2013	13
Figure I.4 : Inflorescence (a) des pieds femelles, (b) des pieds mâles, (c) fleur femelle et (d) fleur mâle (Bouloc 2006 ; Terres Inovia 2015)	16
Figure I.5 : Coupe transversale d'une tige de chanvre (Adaptée de (Correia, Roy, et Goel 2001))	16
Figure I.6 : La tige du chanvre (Terres Inovia 2015)	17
Figure I.7 : Coupe transversale d'une tige de chanvre : mise en évidence des lignines par l'acide phloroglucinol (V : vaisseaux ; F : fibres xylémiennes) (Bouloc 2006)	18
Figure I.8 : Observation de la chènevotte par microscopie électronique à balayage (Barre d'échelle: 100 µm)	19
Figure I.9 : Principaux domaines d'usage du chanvre	22
Figure I.10 : Coproduits de l'industrie du chanvre : (a) chènevis, (b) fibres, (c) chènevotte et (d) poudre organique	23
Figure I.11 : les différents composants de la paille de chanvre et leurs proportions moyennes	27
Figure I.12 : Applications des fibres de chanvre dans le marché européen en 2014 (EIHA 2015)	28
Figure I.13 : Marchés européens de la chènevotte sur la récolte 2010 (44 000 tonnes) (EIHA 2015)	30
Figure I.14 : Représentation schématique de l'architecture d'une paroi cellulaire, mettant en évidence l'emplacement de lignine au sein des polymères de cellulose et d'hémicelluloses..	34
Figure I.15 : Présentation du motif de base des lignines de type phénylpropane C ₉ (C ₆ -C ₃), et de ses dérivés monolignols : alcools p-coumarylique (1), coniferylique (2), sinapylique (3)	35
Figure I. 16 : Les unités composant les structures du phénylpropenyl	35
Figure I.17 : Présentation de différents types de liaisons se trouvant dans la structure de la lignine	37
Figure I.18 : Présentation schématique du complexe lignine-hémicelluloses (Macheix, Fleuriet, et Jay-Allemand 2005)	38
Figure I.19 : Les différentes familles de composés phénoliques rencontrées dans le règne végétal	39

Figure I.20 : Principales structures liant les lignines aux acides p-hydroxycinnamiques Pc et Fe identifiées au sein des parois de graminées	41
Figure I.21 : Structure du polygalacturonane, principal polysaccharide pectique	45
Figure I.22 : Représentation des étapes de l'extraction liquide/solide à partir d'une matrice végétale (Celhay 2013)	47
Figure I.23 : Schéma représentant les coupures de liaison dans le complexe lignine/phenols-polysaccharides en condition alcaline	59
Figure I.24 : Schéma représentant le clivage des complexes lignine/phenols-polysaccharides en condition alcaline (Buranov et Mazza 2009)	60
Figure I.25 : Les deux modes de chauffages : conventionnel et volumétrique (Rostagno et Prado 2013)	63
Figure I.26 : Exemple de la zéolithe de type structural MFI, formée par l'assemblage de tétraèdres (Td) partageant leur sommet	79
Figure II.1 : Lot de chènevotte observé sous loupe binoculaire Z45 Nachet (France)	109
Figure II.2 : Particules de chènevotte observées sous loupe binoculaire Z45 Nachet (France)	109
Figure II.3: Distribution granulométrique des particules du lot de chènevotte (tamiseuse à vibration AS 300 (Retsch, Allemagne))	110
Figure II.4 : Image en microscopie fond clair de coupe transversale (A-C) de chènevotte et de fibres cellulosiques résiduelles (D)	113
Figure II.5 : Images de coupes transversales de chènevotte après coloration au phloroglucinol (A-B), ou réaction au Maïle (C-F)	114
Figure II.6 : Image en microscopie de fluorescence. Les images A à C ont été acquises avec les cubes filtres A, I3 et N2.1	115
Figure II.7 : Image en microscopie confocale (excitation 405 nm) et spectres obtenus à l'émission	116
Figure II.8 : Spectres à l'émission des parois du xylème avec des longueurs d'onde à l'excitation de 700 à 800 nm, obtenus en microscopie confocale biphotonique	117
Figure II.9 : Répartition de la lignine, cellulose et hémicelluloses dans la fraction pariétale. Cas de la chènevotte	119
Figure II.10 : Répartition de lignines, cellulose et hémicelluloses dans la fraction pariétale de différentes variétés de chènevotte	121
Figure II.11 : Rendements en extractibles Fibertec (L/S = 100, reflux, 1 h). Cas de la chènevotte	123

Figure II.12 : Rendements d'extraction en composés phénoliques totaux et teneurs en composés phénoliques des fractions extraites (♦). Cas de la chènevotte	125
Figure II.13 : Rendements d'extraction en acides phénoliques en fonction du solvant. Cas de la chènevotte (n = 3)	126
Figure II.14 : Photographie du lot de poudre organique	128
Figure II.15 : Poudre organique observée sous loupe binoculaire Z45 Nachet (France)	129
Figure II.16 : Distribution granulométrique des particules du lot de poudre organique (tamiseuse à vibration AS 300 (Retsch, Allemagne))	130
Figure II.17 : Fraction tamisée de la poudre organique ; taille supérieure à 6,3 mm	130
Figure II.18 : Répartition de la lignine, cellulose et hémicelluloses dans la fraction pariétale. Cas de la poudre organique	132
Figure II.19 : Rendements en extractibles Fibertec (L/S=100, reflux, 1h). Cas de la poudre organique	133
Figure II.20 : Rendements d'extraction en composés phénoliques totaux et teneurs en composés phénoliques des fractions extraites (♦). Cas de la poudre organique	134
Figure II.21 : Rendements d'extraction en acides phénoliques en fonction du solvant. Cas de la poudre organique (n = 3)	135
Figure II.22 : Rendements en extractibles obtenus en macération, soxhlet, ASE et Fibertec. Cas de la chènevotte	138
Figure II.23 : Rendements d'extraction en polyphénols totaux obtenus par macération, soxhlet, ASE et Fibertec. Cas de la chènevotte	140
Figure II.24 : Rendements d'extraction en composés phénoliques obtenus par hydrolyse alcaline et par extraction Fibertec à l'eau. Cas de la chènevotte	144
Figure II.25 : Rendements en extractibles obtenus en macération, soxhlet, ASE et Fibertec. Cas de la poudre organique	146
Figure II.26 : Rendements d'extraction en polyphénols obtenus par macération, soxhlet, ASE et fibertec. Cas de la poudre organique	147
Figure II.27 : Rendements d'extraction en composés phénoliques obtenus par hydrolyse alcaline et par extraction Fibertec à l'eau. Cas de la poudre organique	148
Figure II.28 : Schéma global du protocole expérimental de l'hydrolyse séquencée	155
Figure II.29 : Hydrolyse, en milieu alcalin, des liaisons formant le complexe lignine/acides phénoliques/ sucres (Buranov et Mazza 2009)	157
Figure II.30 : Rendements d'extraction en PP pour chaque étape de l'hydrolyse séquencée. Comparaison avec l'hydrolyse alcaline en batch. Cas de la chènevotte	159
Figure II.31 : Rendements d'extraction en composés phénoliques lors de l'hydrolyse séquencée. Comparaison avec l'hydrolyse alcaline en batch. Cas de la chènevotte	159

Figure II.32 : Rendements en PP obtenus par hydrolyse séquencée. Comparaison avec l'hydrolyse alcaline en batch. Cas de la poudre organique	164
Figure II.33 : Rendements d'extraction en composés phénoliques lors de l'hydrolyse séquencée. Comparaison avec l'hydrolyse alcaline en batch. Cas de la poudre organique	165
Figure III.1 : Extracteur thermo-mécano-chimique BC21(Clextral)	181
Figure III.2 : Schéma de l'extraction en extracteur bi-vis et post-traitement du filtrat brut	183
Figure III.3 : Schéma général de fonctionnement de l'extrudeur comme extracteur liquide/solide	184
Figure III.4 : Profils de vis pour l'extraction des composés phénoliques de la chènevotte en extrudeur bi-vis BC21.....	186
Figure III.5 : Aspect morphologique des extrudats et filtrats clairs issus de l'extraction de la chènevotte en extrudeur bi-vis	191
Figure III.6 : Teneurs en matières sèche et organique des extrudats pour des extractions en extrudeur bi-vis à 50 °C. Cas de la chènevotte	193
Figure III.7 : Influence du solvant sur la répartition de la matière organique en extracteur bi-vis à 50 °C. Cas de la chènevotte	193
Figure III.8 : Rendements en extractibles dans le filtrat clair (a) et en pied d'extraction (b) à 50 °C par extraction en extrudeur bi-vis. Cas de la chènevotte	195
Figure III.9 : Rendements d'extraction en composés phénoliques totaux et teneurs en composés phénoliques des fractions extraites (♦) dans les filtrats clairs à 50 °C par extraction en extrudeur bi-vis. Cas de la chènevotte	197
Figure III.10 : Rendements en composés phénoliques dans les filtrats clairs obtenus par extraction à 50 °C en extracteur bi-vis. Cas de la chènevotte	199
Figure III.11 : Répartition massique en lignines, cellulose et hémicelluloses dans la fraction pariétale des extrudats	201
Figure III.12 : Rendements en extractibles des extrudats exprimés en mg MO/g MO d'extrudat brut. Cas de la chènevotte	202
Figure III.13 : Rendements en extractibles des extrudats exprimés en mg MO/g MO _i . Cas de la chènevotte	203
Figure III.14 : Rendements en polyphénols extraits des extrudats exprimés en mg MO/g MO _i . Cas de la chènevotte	204
Figure III.15 : Rendements en composés phénoliques dans les différentes sorties de l'extraction en extrudeur bi-vis. Comparaison avec l'hydrolyse alcaline en batch. Cas de la chènevotte	205

Figure III.16 : Profils de vis pour l'extraction des composés phénoliques de la poudre organique en extrudeur bi-vis BC21.....	208
Figure III.17 : Aspect morphologique des extrudats et filtrats clairs issus de l'extraction de la poudre organique en extrudeur bi-vis	211
Figure III.18 : Teneurs en matières sèche et organique des extrudats pour des extractions en extrudeur bi-vis à 50 °C. Cas de la poudre organique	212
Figure III.19 : Influence du solvant sur la répartition de la matière organique en extracteur bi-vis à 50 °C. Cas de la poudre organique	213
Figure III.20 : Rendements en extractibles dans le filtrat clair (a) et en pied d'extraction (b) à 50°C par extraction en extrudeur bi-vis. Cas de la poudre organique	214
Figure III.21 : Rendements d'extraction en composés phénoliques totaux et teneur en composés phénoliques des fractions extraites (♦) dans les filtrats clairs à 50 °C par extraction en extrudeur bi-vis. Cas de la poudre organique	215
Figure III.22 : Rendements en composés phénoliques dans les filtrats clairs obtenus par extraction à 50 °C en extracteur bi-vis. Cas de la poudre organique	217
Figure III.23 : Répartition massique en lignines, cellulose et hémicelluloses dans la fraction pariétale des extrudats	218
Figure III.24 : Rendements en extractibles des extrudats exprimés en mg MO/g MO d'extrudat brut. Cas de la poudre organique	219
Figure III.25 : Rendements en extractibles des extrudats exprimés en mg MO/g MO _i . Cas de la poudre organique	219
Figure III.26 : Rendements en polyphénols extraits des extrudats, exprimés en mgMO/g MO _i . Cas de la poudre organique	220
Figure III.27 : Rendements en composés phénoliques dans les différentes sorties de l'extraction en extrudeur bi-vis. Comparaison avec l'hydrolyse alcaline en batch. Cas de la poudre organique	221
Figure III.28 : Rendements en extractibles par extraction MAE à 50 °C. Cas de la chènevotte	224
Figure III.29 : Rendements d'extraction et teneur (♦) en composés phénoliques totaux des filtrats -Extraction MAE à 50 °C. Cas de la chènevotte	226
Figure III.30 : Rendements d'extraction en composés phénoliques par MAE à 50 °C. Cas de la chènevotte	228
Figure III.31 : Rendement en extractibles - Extraction MAE à 50 °C. Cas de la poudre organique	229
Figure III.32 : Rendements d'extraction et teneur (♦) en composés phénoliques totaux des filtrats -Extraction MAE à 50 °C. Cas de la poudre organique	231

Figure III.33 : Rendements d'extraction en composés phénoliques par MAE à 50 °C. Cas de la poudre organique	232
Figure III.34 : Rendements en polyphénols totaux par extraction en réacteur micro-ondes et en extracteur bi-vis à 50°C. Cas de la chènevotte	233
Figure III.35 : Rendements en polyphénols totaux par extraction en réacteur micro-ondes et en extracteur bi-vis à 50°C. Cas de la poudre organique	235

Liste des tableaux

Tableau I.1 : Surface totale cultivée de chanvre en Europe en 2014 (EIHA 2015)	12
Tableau I.2 : Caractéristiques botaniques de la plante selon la classification APG II	15
Tableau I.3 : Composition chimique de certaines plantes à fibres (en % de la masse totale) (Rigal 2015)	20
Tableau I.4 : Pourcentages des acides gras saturés et insaturés contenus dans l'huile de chanvre (Adapté de Li <i>et al.</i> , 2010)	23
Tableau I. 5 : Variation de la quantité de lignine en fonction du type de la plante et de la fraction étudiée	34
Tableau I.6 : Composition de la lignine selon la source de la biomasse	36
Tableau I.7 : Structures chimiques des acides phénoliques (Macheix, Fleuriet, et Jay-Allemand 2005)	40
Tableau I.8 : Présentation détaillée des phénomènes impliqués dans l'extraction liquide/solide (Celhay 2013)	48
Tableau I.9 : Extraction d'acides phénoliques issus de la matière végétale et de la transformation des résidus lignocellulosiques	50
Tableau I.10 : Exemples de méthodes d'analyse des acides férulique et coumarique	71
Tableau II.1 : Caractéristiques techniques du lot de chènevotte (Agrofibre)	106
Tableau II.2 : Teneurs en matière sèche et en matière minérale de la chènevotte	106
Tableau II.3 : Caractéristiques morphologiques et volumétriques de la chènevotte	109
Tableau II.4 : Composition en minéraux de la chènevotte (n=1)	118
Tableau II.5 : Composition en minéraux de la chènevotte (Bouloc 2006)	118
Tableau II.6 : Analyse chimique de la chènevotte par la méthode Van Soest and Wine (%/MS)	119
Tableau II.7 : Composition chimique de la chènevotte provenant de différentes variétés de chanvre	120
Tableau II.8 : Teneurs en protéines, pectines et cires et corps gras dans la chènevotte	122
Tableau II.9 : Rendements en extractibles Fibertec de la chènevotte	124
Tableau II.10 : Rendements et teneurs en polyphénols totaux dans les extraits. Cas de la chènevotte	125
Tableau II.11 : Rendements d'extraction en acides férulique et <i>p</i> -coumarique. Cas de la chènevotte	127
Tableau II.12 : Caractéristiques de la poudre organique	128

Tableau II.13 : Caractéristiques morphologiques et volumétriques de la poudre organique	129
Tableau II.14 : Répartition des particules de la poudre organique en fonction de leurs tailles	129
Tableau II.15 : Composition en minéraux de la poudre organique (n = 1)	131
Tableau II.16 : Analyse chimique de la poudre organique par la méthode Van Soest and Wine (%/MS)	132
Tableau II.17 : Teneurs en protéines, pectines et cires et corps gras dans la poudre organique	133
Tableau II.18 : Rendements en extractibles Fibertec de la poudre organique (n = 3)	134
Tableau II.19 : Rendements et teneurs en polyphénols totaux des extraits. Cas de la poudre organique	134
Tableau II.20 : Rendements d'extraction en acides férulique et <i>p</i> -coumarique. Cas de la poudre organique	136
Tableau II.21 : Conditions opératoires mises en œuvres pour les extractions des coproduits du chanvre	138
Tableau II.22 : Rendements en extractibles en fonction du solvant et de la méthode d'extraction. Cas de la chènevotte	139
Tableau II.23 : Rendements d'extraction en composés phénoliques ($\mu\text{g/g MO}_i$) obtenus par macération, soxhlet, ASE en duplicat et par Fibertec. Cas de la chènevotte	141
Tableau II.24 : Rendements d'extraction de l'acide férulique par extraction à reflux de l'angélique (Sheu <i>et al.</i> 1987 ; Lu <i>et al.</i> 2005)	142
Tableau II.25 : Comparaison des rendements d'extraction en composés phénoliques dans diverses matières végétales	144
Tableau II.26 : Rendements en extractibles en fonction du solvant et de la méthode d'extraction. Cas de la poudre organique	146
Tableau II.27 : Rendements d'extraction en composés phénoliques ($\mu\text{g/gMO}_i$) obtenus par macération, soxhlet, ASE en duplicat et par Fibertec. Cas de la poudre organique	147
Tableau II.28 : Tableau récapitulatif des rendements d'extraction en composés phénoliques	150
Tableau II.29 : Exemples de répartition des acides férulique et coumarique dans la matière végétale et types de liaisons chimiques engagées	153
Tableau II.30 : Répartition de la matière organique sur les étapes de l'hydrolyse séquencée. Cas de la chènevotte	158
Tableau II.31 : Rendements en polyphénols totaux libres en fonction du solvant et de la technique d'extraction. Cas de la chènevotte	160

Tableau II.32 : Répartition des liaisons dans la structure lignocellulosique pour les acides férulique et coumarique. Cas de la chènevotte	162
Tableau II.33 : Taux de lignine et des hémicelluloses récupérés par hydrolyse séquencée de la chènevotte. Comparaison avec la méthode Van Soest and Wine	162
Tableau II.34 : Répartition de la matière organique sur les étapes de l'hydrolyse séquencée. Cas de la poudre organique	163
Tableau II.35 : Rendements en polyphénols totaux en fonction du solvant et de la technique d'extraction. Cas de la poudre organique	165
Tableau II.36 : Répartition des liaisons chimiques dans la structure lignocellulosique pour les acides férulique et p-coumarique. Cas de la poudre organique	166
Tableau II.37 : Taux de lignine et des hémicelluloses récupérés par hydrolyse séquencée de la poudre organique. Comparaison avec la méthode Van Soest and Wine	167
Tableau III.1 : Conditions opératoires des essais préliminaires pour l'extraction aqueuse en extrudeur bi-vis des composés phénoliques de la chènevotte	185
Tableau III.2 : Conditions opératoires et débits massiques entrants et sortants pour les essais d'extraction de la chènevotte en extrudeur bi-vis BC21	189
Tableau III.3 : Rendements d'extraction en molécules d'intérêt par extraction en extrudeur bi-vis. Cas de la chènevotte	190
Tableau III.4 : Taux de matière sèche, de matière minérales et caractérisation chimique par la méthode Van Soest and Wine des extrudats des essais CH8 et CH9	200
Tableau III.5 : Rendements en composés phénoliques dans les filtrats clairs et extraits des extrudats. Cas de la chènevotte	205
Tableau III.6 : Profils de vis testés pour l'extraction aqueuse en extrudeur bi-vis des composés phénoliques de la poudre organique	207
Tableau III.7 : Conditions opératoires et débits massiques entrants et sortants pour les essais d'extraction de la poudre organique en extrudeur bi-vis BC21	209
Tableau III.8 : Rendements d'extraction en molécules d'intérêts par extraction en extrudeur bi-vis. Cas de la poudre organique	210
Tableau III.9 : Taux de matière sèche, de matière minérales et caractérisation chimique par la méthode Van Soest and Wine des extrudats des essais P8 et P9	218
Tableau III. 10 : Rendements en composés phénoliques dans les filtrats clairs et extraits des extrudats. Cas de la poudre organique	221
Tableau III.11 : Conditions opératoires des essais d'extraction de la chènevotte en MAE ..	223

Tableau III.12 : Rendements d'extraction MAE. Comparaison avec l'extraction en extrusion bi-vis et l'hydrolyse alcaline en batch. Cas de la chènevotte	225
Tableau III.13 : Conditions opératoires des essais d'extraction de la poudre organique en MAE	228
Tableau III.14 : Rendements d'extraction MAE. Comparaison avec l'extraction en extrusion bi-vis et l'hydrolyse alcaline en batch. Cas de la poudre organique	230
Tableau III.15 : Tableau récapitulatif des rendements d'extraction en acides phénoliques de la chènevotte	234
Tableau III.16 : Tableau récapitulatif des rendements d'extraction en acides phénoliques de la poudre organique	238

Introduction générale

Le concept de bioraffinerie est de plus en plus présent en Europe et l'on assiste à une forte focalisation politique et technique sur la valorisation énergétique de la biomasse sous ses différentes formes. Cependant, une attention insuffisante est encore donnée aux agroressources comme réserve potentielle pour l'industrie chimique. Le remplacement de composés issus de la pétrochimie par ceux issus des agroressources pourrait jouer un rôle clé dans le maintien de la croissance de l'industrie chimique notamment en raison de la mise en application depuis 2008 de la directive REACH. L'industrie des fibres végétales (chanvre, lin, ...) a besoin de développer des applications pour les résidus lignocellulosiques (son, paille, tige) pour le maintien de leur filière. Pour valoriser au maximum l'obtention d'agroproduits, il est nécessaire de trouver des destinations à toutes les parties des plantes étudiées.

Les procédés industriels de transformation des grandes productions végétales génèrent des quantités importantes de coproduits susceptibles de trouver une valorisation en tant que sources de molécules à très haute valeur ajoutée. La recherche de nouvelles voies de valorisation chimique ou parachimique des plantes entières ou bien des résidus de transformation doit inexorablement faire l'objet d'une meilleure connaissance de leurs constituants, de la maîtrise des procédés d'extraction et de purification et également de la caractérisation physico-chimique des extraits et raffinats. Ces données permettront alors de pouvoir élaborer de nouvelles stratégies de valorisation des agroressources donnant lieu à de nouveaux débouchés aux filières traditionnelles.

La filière chanvre en est un exemple. Différentes voies de transformation des coproduits issus de l'industrie des fibres de chanvre sont envisagées pour la production de monomères aromatiques à haute valeur ajoutée, à partir de différents procédés de fractionnement.

L'objectif de ce travail s'inscrit dans le cadre de l'exploitation/valorisation du carbone renouvelable par l'utilisation industrielle non alimentaire (VANA) des produits et des sous-produits de l'agriculture et de la forêt ainsi que celle des co-produits issus des agro-industries. Il concerne la valorisation de coproduits et sous-produits du chanvre (*Cannabis sativa* L.) générés de manière inévitable lors du défibrage industriel de la plante (*i.e.* extraction mécanique des fibres techniques longues) : la chènevotte et la poudre organique. Les voies de valorisation envisagées, dans ces travaux, se détachent des voies classiques pour l'obtention

des molécules ciblées, qui sont les monomères aromatiques, et généralement axées sur des voies biotechnologiques.

Les familles de molécules ciblées *i.e.* les acides hydroxycinnamiques n'ont pas fait jusqu'à présent l'objet d'études pour la valorisation de ces matières secondaires plutôt destinées au domaine des agromatériaux. Cependant, les applications industrielles peuvent être diverses dans les domaines de la cosmétique, de l'industrie des arômes et parfums mais aussi dans le domaine de la santé pour des produits plus spécifiques entrant dans les formulations nutraceutiques.

La démarche scientifique des travaux présentés dans ce mémoire s'inscrit dans une stratégie complémentaire relative à la raffinerie du végétal à travers le fractionnement des agroressources et traitant de la valorisation d'agromolécules issues de la cellulose ou d'hémicelluloses. Elle s'articule en trois étapes d'acquisition de connaissances, (i) sur les matières premières, (ii) les procédés de fractionnement et (iii) les extraits et raffinats issus de ces procédés.

Dans un premier chapitre, après avoir décrit la filière chanvre dans le monde et en France, un bilan bibliographique des connaissances sur la structure chimique des différents organes de la plante sera établi. Nous décrivons en particulier, la localisation et la structure chimique des principaux constituants de la matière végétale et plus particulièrement, de la lignine dont les acides hydroxycinnamiques peuvent être extraits. Les procédés d'extraction et les méthodes d'analyse des acides hydroxycinnamiques sont mentionnés. L'utilisation potentielle des zéolithes dans les procédés d'enrichissement pour la valorisation des acides phénoliques est aussi présentée.

Le second chapitre de ce manuscrit est consacré à la caractérisation des deux coproduits de la filière chanvre et à la détermination de leur potentiel en composés phénoliques. Dans un premier temps, la répartition des principaux constituants cellulose, hémicelluloses, lignine, protéines, pectines et minéraux, de la chènevotte et de la poudre organique, est détaillée ainsi que celle de composés minoritaires tels que les composés phénoliques. Enfin la caractérisation de liaisons éthers/esters dans les coproduits lignocellulosiques du chanvre est abordée à travers une hydrolyse séquencée des matières en milieu alcalin puis acide. Le

protocole choisi permet d'isoler les acides férulique et *p*-coumarique ainsi que d'autres composés phénoliques liés à la structure lignocellulosique.

Le troisième chapitre est consacré au fractionnement des coproduits qui sont la chènevotte et la poudre organique, pour l'obtention d'extraits et raffinats riches en acides phénoliques. Les résultats des extractions qui ont été réalisées d'une part en réacteur continu thermo-mécano-chimique puis en réacteur batch assisté par micro-ondes sont comparés à ceux de la série de fractionnements analytiques détaillés dans le deuxième chapitre. Les extractions ont été comparées entre elles ainsi qu'à l'extraction discontinue de référence pour pouvoir proposer et décrire les conditions opératoires qui permettront de valoriser au mieux, les extraits et les raffinats issus du fractionnement des deux coproduits du chanvre qui sont à la base de nos travaux.

Le quatrième chapitre du manuscrit traite de la concentration des extraits *via* l'utilisation des zéolithes. Différents solides microporeux ont été testés pour évaluer la pertinence de leur utilisation dans une étape de purification/concentration d'extraits issus du fractionnement en réacteur assisté par micro-ondes ou en réacteur thermo-mécano-chimique de la chènevotte et de la poudre organique. Dans un premier temps, la capacité d'adsorption d'acides hydroxycinnamiques (acide férulique, acide *p*-coumarique et acide cinnamique) a été étudiée en batch sur des zéolithes à partir de solutions modèles. Les influences du pH et du temps de contact sur l'adsorption seront évaluées, puis les capacités maximales d'adsorption ont été calculées.

Les connaissances acquises au cours des différents chapitres, nous amènent à proposer un nouveau schéma raisonné d'agroraffinage pour la chènevotte et la poudre organique en réacteur thermo-mécano-chimique.

Chapitre I: *Le chanvre (*Cannabis sativa*) source de composés à haute valeur ajoutée*

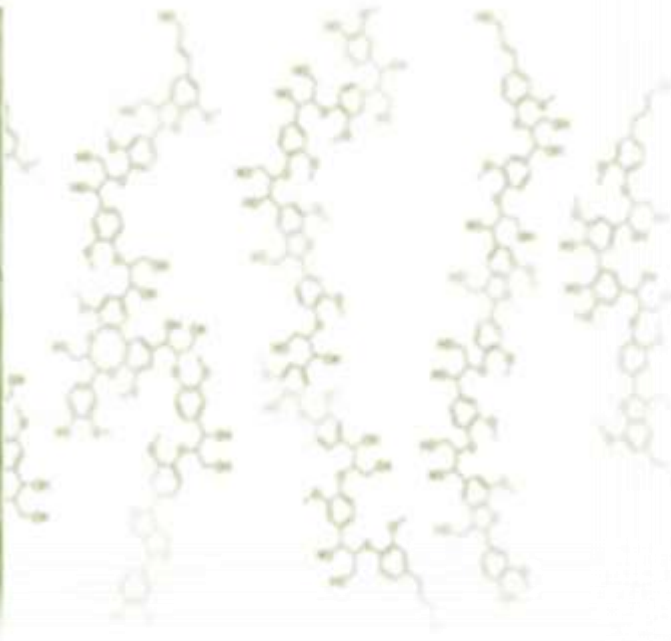
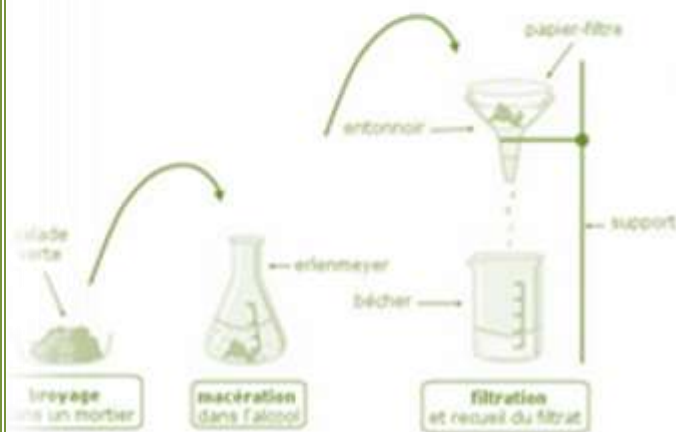
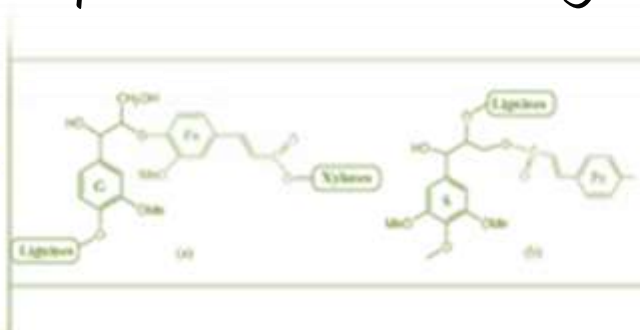


Table des matières

I. 1. Le chanvre et ses coproduits : état de connaissance	10
I.1.1. Description générale de la plante	14
a. Caractéristiques botaniques et physiologiques de la plante	14
b. Culture du chanvre	21
I.1.2. Utilisation du chanvre et de ses coproduits en Europe et en France.....	22
I.1.2.1. La graine de chanvre ou chènevis	23
I.1.2.2. Les fibres	25
a. Procédés de défibrage	26
b. Utilisation de la fibre	27
c. Coproduits.....	29
- Chènevotte	29
- Poudre organique	30
I.1.3. Les coproduits du chanvre : une source potentielle de composés bioactifs.....	31
I.1.3.1. Localisation et structure chimique des principaux constituants.....	31
I.1.3.1.1. Cellulose et hémicelluloses	32
I.1.3.1.2. Lignine.....	33
I.1.3.2. Acides phénoliques.....	38
I.1.3.3. Autres constituants pariétaux	44
I. 2. Extraction des acides férulique et coumarique	46
I.2.1. Principes généraux de l'extraction de la matière végétale	46
I.2.2. Méthodes d'extraction des acides férulique et coumarique.....	49
I.2.3. Technologies potentielles applicables à l'extraction des acides férulique et coumarique	62
I.2.3.1. Micro-ondes.....	62
I.2.3.2. Extrusion Bi-vis.....	65
I. 3. Analyse des acides férulique et coumarique.....	68
I. 4. Concentration et purification des extraits.....	74

I.4.1. Séparation membranaire.....	74
I.4.2. Adsorption.....	75
I.4.2.1. Généralités	75
I.4.2.2. Les zéolithes	78
I. 5. Conclusion	82
I. 6. Références	84

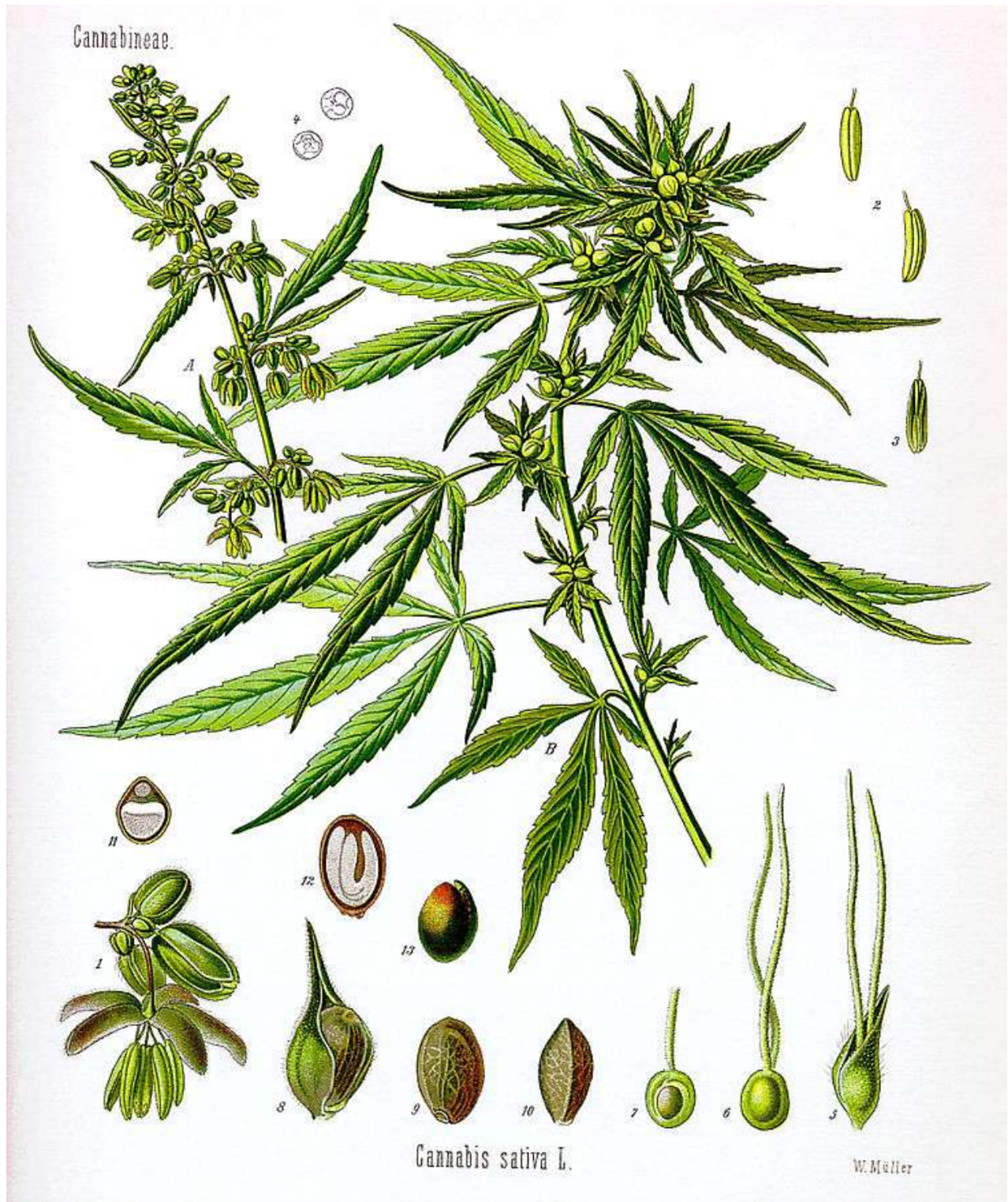


Figure I.1 : Planche botanique du chanvre- *Cannabis sativa* L. par (Köhler 1897)

I. 1. Le chanvre et ses coproduits : état de connaissance

Originaire de l'Asie de l'ouest et de l'Asie centrale (Russie, Chine, Inde, Pakistan et Iran) (Anwar, Latif, et Ashraf 2006), le chanvre « *Cannabis sativa* », est une plante annuelle connue depuis plus de 8 000 ans pour son intérêt en tant que source de fibres pour le textile et le papier, d'huile et de protéines pour l'alimentation humaine et de cannabinoïdes pour des usages médicamenteux. Il était cultivé majoritairement pour sa fibre textile et sa graine oléagineuse (CAB des Pays de la Loire 2015). Les feuilles et les fleurs de la plante contenant les cannabinoïdes étaient employées dans le domaine médical (Turner, Elsohly, et Boeren 1980). Les cannabinoïdes représentent une classe de composés retrouvés seulement dans le *Cannabis sativa*. Ce sont des terpènes phénoliques naturels ayant 21 atomes de carbone (Hemphill, Turner, et Mahlberg 1980).



Figure I.2 : Récolte et travail du chanvre en 1695 (Du Bos d'Elbhecq et Faudet 1862)

Au XIX^{ème} siècle, l'arrivée du coton, du charbon et du pétrole a conduit à l'abandon progressif de la culture du chanvre en Europe (CELC 2015). C'était aussi la conséquence des nouvelles technologies et des importations : les bateaux à vapeur ont remplacé les bateaux à voile et donc le chanvre qui servait à la produire. Le jute importé est devenu le concurrent du chanvre produit sur place qui était à son tour remplacé par le chanvre importé à faibles prix. Comme exemple sur l'effet de ces facteurs, citons le cas de la France où la production nationale de chanvre a diminué de 65 % à 24 % de 1865 à 1914 (Bouloc 2006).

Aux Etats-Unis, les progrès de la chimie introduisirent les fibres synthétiques et essentiellement du nylon en 1938 (Brevet du nylon en 1938) comme alternative aux fibres naturelles. En 1937, la taxation de tous les acteurs de la filière chanvre ou "*Marijuana Tax Act*" bannit le chanvre des cultures.

Dès 1945, la culture du chanvre a été définitivement abandonnée dans tous les pays du monde (CELC 2015). Mais récemment (dans les années 1950-1960), la culture du chanvre industriel a été de nouveau introduite en Europe et notamment en Allemagne, en France, aux Pays-Bas, au Royaume-Uni, en Espagne et en Italie. Ce regain d'intérêt vient du fait que le chanvre est une plante non alimentaire, particulièrement intéressante en termes de résistance, de culture sans pesticides ou herbicides, et de rendement en biomasse comparable à de nombreuses autres cultures (Struik *et al.* 2000).

La France est aujourd'hui le leader européen en termes de production et de transformation du chanvre. En 2014, 10 500 ha de chanvre (plus de 50 % des surfaces européennes) sont cultivés en France contre 17 523 ha dans l'Union Européenne (Tableau I.1) avec une augmentation de la part de la production destinée aux graines (EIHA 2015).

Tableau I.1 : Surface totale cultivée de chanvre en Europe en 2014 (EIHA 2015)

Pays	Société	Surface cultivée (ha)	Surface totale cultivée par pays (ha)
Pays-Bas	HempFlax	534	1 462
	Dun Agro	928	
Allemagne	HempFlax (Ouest)	209	486
	HempFlax/BaFa(Est)	127	
	Hanf Farm	150	
Autriche	BaFa	550	550
Royaume-Uni	Petits producteurs	160	160
France	LCDA	5 400	10 500
	Internal Eurochanvre	1 700	
	Planète Chanvre	850	
	Cavac	1 100	
	CCPSC	730	
	Est Chanvre	120	
	Agriculteurs indépendants	600	
Italie	Assocanapa	500	500
Roumanie	HempFlax Europe S.R.L.	650	750
	Agraficient S.R.L.	100	
Hongrie	Hempro Int. GmbH & Co KG	250	350
	Hemp Factory	100	
Danemark	Dun Agro	162	162
République Tchèque	Petits producteurs	210	210
Slovénie	Petits producteurs	500	500
Slovaquie	Petits producteurs	67	67
Croatie	Petits producteurs	300	300
Lituanie	Petits producteurs	1 061	1 061
Lettonie	Petits producteurs	250	250
Estonie	Petits producteurs	210	210
Portugal	CANAPOR	5	5
Total			17 523

Les surfaces cultivées en France en 2014 sont équivalentes à celles cultivées en 2013 et 2012 qui étaient d'environ 11 000 ha d'après l'institut technique des producteurs d'oléagineux, de protéagineux, de chanvre et de leurs filières (Terres Inovia). La Surface Agricole Utile (SAU) moyenne des exploitations chanvrières françaises est supérieure à 200 ha et identique depuis ces quatre dernières années. Les deux principaux bassins de production de chanvre sont situés dans l'est de la France et regroupent La Chanvrière De l'Aube (LCDA) et Planète

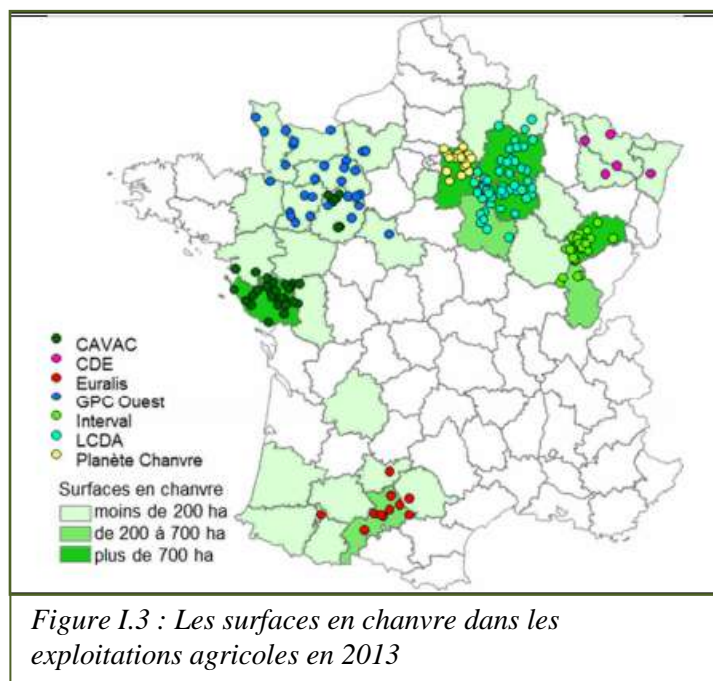


Figure I.3 : Les surfaces en chanvre dans les exploitations agricoles en 2013

Chanvre (PC) (Figure I.3). Les surfaces cultivées en chanvre ont augmenté entre 2011 (13 ha en moyenne) et 2013 (17 ha). D'après Terres Inovia, la part de chanvre dans la SAU représentait en 2013 plus de 8 % (Terres Inovia 2015).

D'après les données statistiques de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO stat 2015), la surface totale cultivée dans tous les pays du monde a atteint en 2013, 62 000 ha avec approximativement 40 000 ha pour les fibres et 22 000 ha pour les graines (majoritairement en Chine et en Europe).

Jusqu'à la fin des années 1990, l'industrie papetière a été le seul véritable débouché industriel du chanvre. Le développement actuel de nouveaux marchés comme le bâtiment et la plasturgie offre au chanvre de nouvelles perspectives. L'intégralité de la plante est valorisable et trouve des applications variées. Certains estiment que le marché mondial pour le chanvre se compose de plus de 25 000 produits dans neuf sous-marchés : agriculture, textiles, recyclage, automobile, mobilier, aliment/nutrition/boissons, papier, matériaux de construction, et soins personnels (EIHA 2015).

L'évolution du marché du chanvre explique l'intérêt porté à pour la valorisation de l'intégralité de la plante. Plusieurs travaux se concentrent actuellement sur la recherche de nouvelles applications pour les différents coproduits de la plante : fibres, chènevotte et graines.

I.1.1. Description générale de la plante (du chanvre)

Le chanvre utilisé de nos jours en Europe désigné par le terme « industriel » ou « à fibres » est une plante contenant de faibles quantités de δ -9-tetrahydrocannabinol (THC) (moins de 0,2 %) (Bouloc 2006). Cette dénomination permet de le différencier du chanvre à semence (CAB des Pays de la Loire 2015).

Actuellement, quarante-sept variétés de chanvre industriel sont d'origine européenne. Ces variétés sont souvent peu adaptées aux régions hors de l'Europe, les conditions climatiques et les latitudes étant différentes de celles existantes en Europe.

Le chanvre industriel compte aussi des variétés originaires de l'Asie de l'Est (Girouard, Mehdi, et Samson, 1999).

a. Caractéristiques botaniques et physiologiques de la plante

Le chanvre est une plante dicotylédone herbacée appartenant à la famille des Cannabaceae. Selon la classification de Cronquist de 1981, cette famille appartient à l'ordre des Urticales, alors que la classification phylogénique Angiosperm Phylogeny Group II (Bremer *et al.* 2003) la classe dans l'ordre des Rosales. Néanmoins, dans les deux cas, dans la famille des Cannabaceae le genre *Cannabis* est associé à l'espèce *Cannabis sativa* L qui se subdivise en trois sous espèces :

- *C. sativa ssp indica* (ou chanvre indien) : la forme psychotrope,
- *C. sativa ssp ruderalis* ou « *spontanea* » : forme dite sauvage,
- *C. sativa ssp sativa* : variété industrielle, source de fibres et de graines.

Selon (Bouloc 2006), l'espèce *Cannabis sativa* L regroupe deux sous espèces : *Cannabis sativa ssp spontanea* pour la forme sauvage et *Cannabis sativa ssp culta* pour les formes cultivées.

Les caractéristiques morphologiques et physiologiques de la variété industrielle dépendent de la nature de la terre où elle a été cultivée. Il en est de même pour la qualité des fibres, des graines et du tétrahydrocannabinol (THC).

Tableau I.2 : Caractéristiques botaniques de la plante selon la classification APG II

Règne végétal	Plante
Embranchement	Spermatophytes (plantes à graines)
Sous embranchement	Angiosperme (plantes à ovaires)
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Archichlamydées (plantes à pétales séparées)
Ordre	Rosales
Famille	Cannabacées
Genre	<i>Cannabis</i>
Espèce	<i>Sativa</i>

Il existe deux types de chanvre industriel (*Cannabis sativa ssp sativa*) : monoïque (obtenu après amélioration génétique) et dioïque (présent naturellement, constitué d'une population d'individus à caractère mâle ou femelle).

A noter que les variétés originaires de la France sont toutes monoïques (Girouard, Mehdi, et Samson, 1999 ; Bouloc 2006).

La plante peut atteindre plus de trois mètres de haut. Le diamètre moyen de la tige est de 1 à 3 cm. Sa tige est droite, dressée, cannelée et plus ou moins ramifiée. Ses feuilles épineuses ont des bords dentés. Elles sont palmées en 5 à 7 segments inégaux et s'insèrent sur la tige selon une disposition opposée tous les 10 à 30 cm. La plante est caractérisée par de longues et fines fleurs. Elle présente des poils glanduleux qui la rendent odorante et gluante (Anwar, Latif, et Ashraf 2006 ; Bouloc 2006).

C'est seulement durant la dernière phase de croissance, lorsque débute la formation des fleurs, que la détermination du sexe devient possible. Les fleurs femelles (Figure I.4c) se distinguent nettement des fleurs mâles (Figure I.4d).

Les fleurs femelles dépourvues de pétales, se composent de deux longs stigmates blancs, jaunes ou roses. Leur calice, pas plus long que 3-6 mm, enveloppe l'ovaire renfermant un seul ovule. Le calice est complètement entouré d'un carpelle. Les fleurs femelles apparaissent par paire, à l'aisselle de petites feuilles (bractées). Au niveau de ces bractées sont concentrés de nombreux trichomes (poils) glandulaires où s'accumulent les cannabinoïdes dans le cas des variétés riches en THC.

Les fleurs mâles possèdent 5 sépales de quelques 5 mm de longueur, de couleur jaune, blanche ou verte. Elles fleurissent inclinées vers le bas et possèdent 5 étamines longues d'environ 5 mm (Bouloc 2006 ; Botineau 2010).

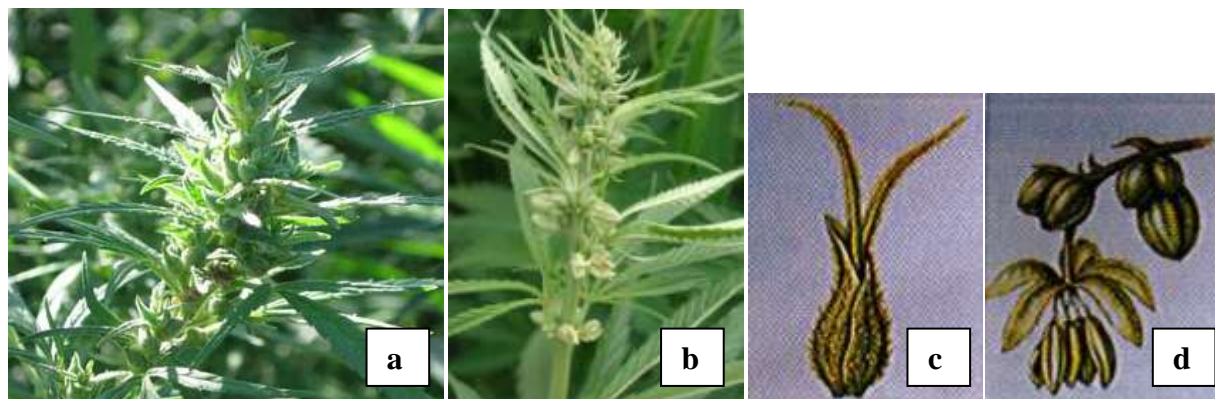


Figure I.4 : Inflorescence (a) des pieds femelles, (b) des pieds mâles, (c) fleur femelle et (d) fleur mâle (Bouloc 2006 ; Terres Inovia 2015)

Les graines de chanvre sont de forme ovoïde ou sphérique et elles mesurent de 3 à 5 mm de longueur. Chaque graine renferme deux cotylédons riches en substances de réserves (protéines et huile). L'albumen est particulièrement réduit comparé à d'autres espèces végétales (Bouloc 2006).

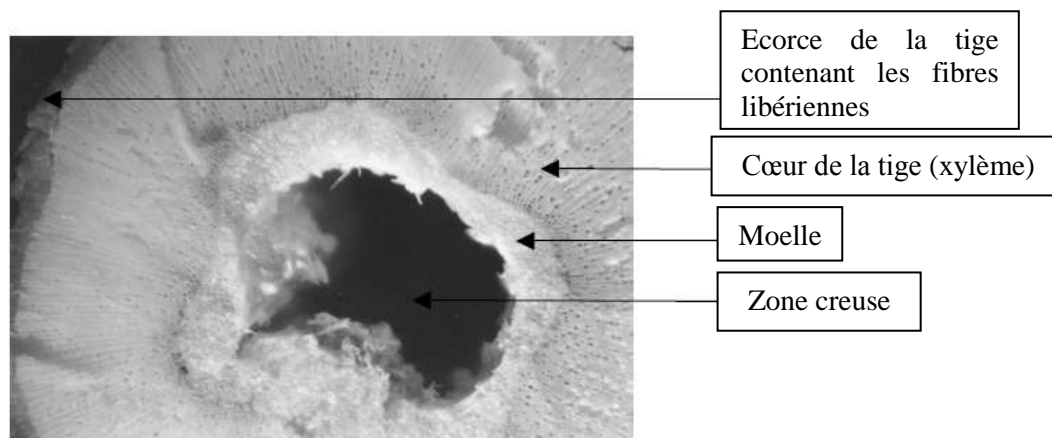


Figure I.5 : Coupe transversale d'une tige de chanvre (Adaptée de (Correia, Roy, et Goel 2001))

La tige (Figure I.5) se compose d'un cylindre creux comportant le xylème de 1-5 mm d'épaisseur couvert par le cambium de 10-50 μm , le cortex de 100-300 μm , l'épiderme de 20-100 μm et la cuticule de 2-5 μm (Dupeyre et Vignon 1998).



Figure I.6 : La tige du chanvre (Terres Inovia 2015)

La tige du chanvre peut être divisée en deux principales zones morphologiques :

- **les fibres** situées à la périphérie de la tige, liées par la lamelle moyenne et disposées en faisceaux. Ces fibres dites primaires se caractérisent par leur longueur, une paroi cellulaire très épaisse et une composition chimique particulière. Elles sont séparées par les cellules du parenchyme cortical riche en pectine et hémicelluloses. En particulier, les fibres contiennent une quantité considérable de cellulose et peu de polysaccharides non cellulosiques, de protéines, et de lignines. Leurs parois secondaires épaisses se caractérisent par la présence de cellulose hautement cristalline (Crônier, Monties, et Chabbert 2005).
- **le cœur de la tige** (xylème) aussi appelé « chènevotte » ou bois de chanvre constitué de cellules lignifiées, de fibres ligneuses, de vaisseaux et de rayons de cellules (Figure I.7) et qui donne sa résistance à la plante. On assimile ses propriétés à celles du bois dur (Vignon, Garcia-Jaldon, et Dupeyre 1995 ; Crônier, Monties, et Chabbert 2005).

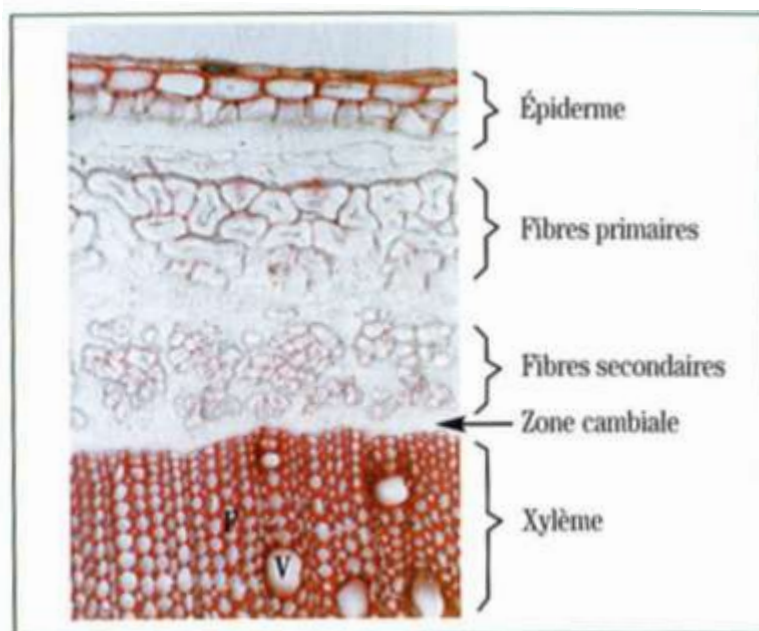


Figure I.7 : Coupe transversale d'une tige de chanvre : mise en évidence des lignines par l'acide phloroglucinol (V : vaisseaux ; F : fibres xylémiennes) (Bouloc 2006)

Les fibres secondaires sont générées à partir du cambium. Elles sont appelées aussi fibres extra-xylémiennes. Ces fibres restent généralement accrochées au bois (chènevotte) lors des procédés de défibrage et elles sont connues sous le nom de « fibres techniques ».

Selon Vignon *et al.*, les fibres d'une tige de chanvre récoltée fin juin se distinguent des « *woody fibers* » (fibres de bois) constituant la chènevotte par :

- une longueur 10 à 100 fois plus grande,
- un même diamètre,
- des cellules de la paroi des fibres 5 à 10 fois plus épaisses.

La Figure I.8 ci-dessous montre l'image des cellules de chènevotte obtenue par microscopie électronique à balayage. Les fibres sont courtes et s'écartent les unes des autres. Celles-ci ont le même diamètre que les fibres du bois dur, mais sont plus courtes avec des parois cellulaires plus fines (Vignon, Garcia-Jaldon, et Dupeyre 1995).

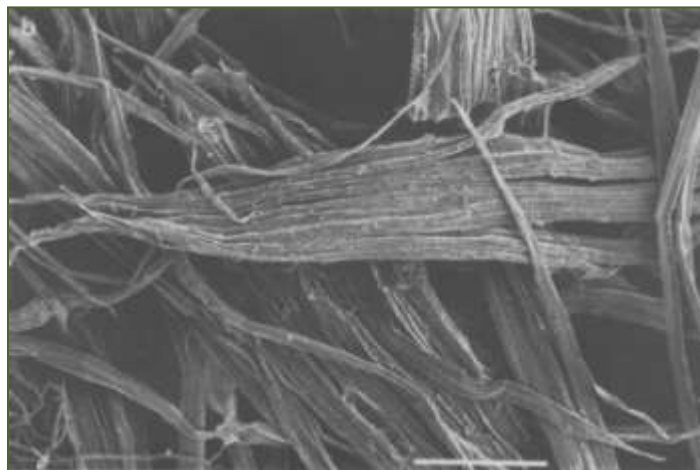


Figure I.8 : Observation de la chènevotte par microscopie électronique à balayage (Barre d'échelle: 100 μ m)

De même, d'autres études ont montré que les caractéristiques physiques des « *woody fiber* » sont très semblables à celles du bois dur et que ces fibres sont considérablement plus longues que celles du bois tendre ou résineux (Correia, Roy, et Goel 2001).

La composition chimique montre que les fibres de chanvre contiennent une plus grande proportion d'holocellulose (plus des deux tiers étant de type alphacellulose) par rapport aux bois durs et tendres. Elles contiennent aussi considérablement moins de lignine (10 %) que le bois dur (20-22 %) et tendre (27-28 %) (Correia, Roy, et Goel 2001).

Au stade de la maturité du grain, l'écorce de la tige contient 4 % de pectines, 4 % d'hémicellulose, 2 % de lignine, et 75 % de cellulose. Les études ont montré que la teneur en cellulose augmente de façon continue avec l'âge de la plante, alors qu'avec l'apparition de la floraison, la proportion en hémicelluloses commence à diminuer contrairement à la proportion de lignine (Toonen *et al.* 2004 ; Crônier, Monties, et Chabbert 2005).

Lors des années de sa prohibition, la fibre isolée du chanvre était remplacée par d'autres plantes comme le jute, le lin et le bois. Actuellement, elle fait face à la concurrence de multiples matériaux de caractéristiques semblables tels que le lin, la ramie et le jute (Tableau I.3).

Tableau I.3 : Composition chimique de certaines plantes à fibres (en % de la masse totale) (Adapté de Rigal 2015)

	Plante	Cellulose		Hémice- lluloses		Lignine		Pectine		Référence
		Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	
Tige	Chanvre	59	77	17 (Godin <i>et al.</i> 2010)		4	7	Nd	Nd	(Han 1998 ; Struik <i>et al.</i> 2000 ; Godin <i>et al.</i> 2010)
	Kénaf	53 (Godin <i>et al.</i> 2010)		18	27	7	8	Nd	Nd	(Han 1998 ; Godin <i>et al.</i> 2010)
	Jute	45	63	18	21	21	26	Nd	Nd	(Han 1998)
	Lin (à fibre)	45	60	14	27	2	14	1,8	2,3	(Dambroth et Seehuber 1988 ; Han 1998)
	Lin (à graine)	43	47	24	26	21	23	Nd	Nd	(Han 1998)
	Ramie	68	87	8	13	0,5	1,3	4-5	5	(Han 1998 ; Pandey 2007)
Bois	Chanvre	40	52	12	30	22	30	5,5	6	(Williams et Wool 2000 ; Kymäläinen et Sjöberg 2008 ; Lips <i>et al.</i> 2009 ; Ross et Mazza 2010 ; Gandolfi <i>et al.</i> 2013)
	Kenaf	33	49	14	41	15	25	2-6	6	(Webber, Whitworth, et Dole 1999 ; Finell 2003 ; Ververis <i>et al.</i> 2004 ; Lips <i>et al.</i> 2009 ; Akil <i>et al.</i> 2011)
	Jute	41	48	18	22	21	24	Nd	Nd	(Han 1998)
	Lin	34	53	13	26	23	31	5 (Popa <i>et al.</i> 2013)		(Williams et Wool 2000 ; Kymäläinen et Sjöberg 2008 ; Lips <i>et al.</i> 2009 ; del Rio <i>et al.</i> 2011 ; Stevulova <i>et al.</i> 2012 ; Popa <i>et al.</i> 2013)
Fibres	Chanvre	63	92	5	24	3	10	0,9	18	(Dupeyre et Vignon 1998 ; Correia, Roy, et Goel 2001 ; Finell 2003 ; Franck 2005 ; Mwaikambo 2006 ; Taj, Munawar, et Khan 2007 ; Kymäläinen et Sjöberg 2008 ; Yao <i>et al.</i> 2008 ; Akil <i>et al.</i> 2011 ; Dittenber et GangaRao 2012 ; Ho <i>et al.</i> 2012 ; John, Thomas, et Clark 2012 ; Khalil, Bhat, et Yusra 2012)
	Kenaf	31	87	15	27	3	23	2	5	(Saikia, Goswami, et Ali 1997 ; Khristova, Bentcheva, et Karar 1998 ; Finell 2003 ; Ververis <i>et al.</i> 2004 ; Franck 2005 ; Mwaikambo 2006 ; Reddy et Yang 2007 ; Taj, Munawar, et Khan 2007 ; Yao <i>et al.</i> 2008 ; Akil <i>et al.</i> 2011 ; Dittenber et GangaRao 2012 ; Ho <i>et al.</i> 2012 ; John, Thomas, et Clark 2012 ; Khalil, Bhat, et Yusra 2012)
	Jute	51	84	12	20	5	13	0,2	0,4	(Finell 2003 ; Franck 2005 ; Mwaikambo 2006 ; Taj, Munawar, et Khan 2007 ; Yao <i>et al.</i> 2008 ; Akil <i>et al.</i> 2011 ; Dittenber et GangaRao 2012 ; Ho <i>et al.</i> 2012 ; John, Thomas, et Clark 2012 ; Khalil, Bhat, et Yusra 2012 ; Saw, Sarkhel, et Choudhury 2012 ; Fidelis <i>et al.</i> 2013)
	Lin	60	78	14	21	2	5	2,3 (Taj, Munawar, et Khan 2007 ; Dittenber et GangaRao 2012)		(Finell 2003 ; Franck 2005 ; Mwaikambo 2006 ; Taj, Munawar, et Khan 2007 ; Kymäläinen et Sjöberg 2008 ; Akil <i>et al.</i> 2011 ; del Rio <i>et al.</i> 2011 ; Dittenber et GangaRao 2012 ; Ho <i>et al.</i> 2012 ; John, Thomas, et Clark 2012 ; Khalil, Bhat, et Yusra 2012 ; Bourmaud <i>et al.</i> 2013)
	Grande ortie	79	86	10	13	1	4	Nd	Nd	(Franck 2005 ; Mwaikambo 2006 ; Taj, Munawar, et Khan 2007 ; Akil <i>et al.</i> 2011 ; Dittenber et GangaRao 2012 ; Ho <i>et al.</i> 2012 ; John, Thomas, et Clark 2012)
	Ramie	69	93	5	17	0,5	1	1	2	(Franck 2005 ; Pandey 2007 ; Taj, Munawar, et Khan 2007 ; Akil <i>et al.</i> 2011 ; Dittenber et GangaRao 2012 ; Ho <i>et al.</i> 2012 ; John, Thomas, et Clark 2012 ; Khalil, Bhat, et Yusra 2012)

b. Culture du chanvre

Le chanvre représente une excellente culture grâce à sa croissance très rapide ; il est semé en mai (le dernier parmi les cultures de printemps) et récolté en septembre. Il est donc caractérisé par son développement rapide et son cycle cultural court (Annexe 1).

C'est une plante robuste peu exigeante en eau et fertilisants. C'est aussi une plante nettoyante qui couvre rapidement le sol et étouffe toute autre végétation présente. En effet, le chanvre est reconnu comme étant très compétitif aux mauvaises herbes. Il libère le sol tôt (en septembre), laissant une terre, non seulement propre, mais aussi ameublie en profondeur par son système racinaire. Les racines de la plante sont profondes et très ramifiées ce qui permet d'améliorer la structure du sol, d'augmenter sa capacité hydrique et de protéger de l'hydromorphie.

Etant donné qu'aucune maladie ou ravageur ne provoquent de pertes significatives de rendement, la culture ne nécessite aucun traitement phytosanitaire. Ces caractéristiques font du chanvre une plante ne nécessitant que peu de travail en amont de sa culture et pouvant s'adapter à différentes terres (Terres Inovia 2015).

La culture du chanvre s'adapte alors bien au mode de production biologique puisque c'est une plante qui ne demande pas d'entretien en désherbage du fait de sa forte couverture du sol.

Pour la récolte du chanvre, le moment et la procédure diffèrent si l'on vise la production de graines ou de fibres :

- Pour la production de fibres, la récolte s'effectue entre le début et la fin de la floraison à l'aide d'une andaineuse à barre de coupe non rotative.

La qualité de la fibre récoltée quand les graines arrivent à maturité est moindre et impropre à la production de textiles (Girouard, Mehdi, et Samson, 1999). En plus de la date de récolte, la variété de chanvre, la nature du sol, la disponibilité en eau, les épandements (principalement azotés), et la densité de semis sont aussi des facteurs qui influencent les rendements en fibres longues de chanvre. La densité de semi est un facteur déterminant qui entraîne un auto-éclaircissement et donc une perte de rendement, pour une densité de semis supérieure à 45-55 kg de graines par hectare (Abot 2010).

- Pour la production de graines, la récolte s'effectue 40 jours après la récolte de la fibre à l'aide d'une moissonneuse-batteuse (Girouard, Mehdi, et Samson, 1999).

I.1.2. Utilisation du chanvre et de ses coproduits en Europe et en France

Après plusieurs années de prohibition, le chanvre s'inscrit dans la modernité et l'innovation. Il entre aujourd'hui dans des applications liées à l'environnement : puits de carbone, capteur de métaux lourds (Linger *et al.* 2002 ; Cojocaru et Macoveanu 2011), digesteur d'effluents d'égoûts, performant pour l'éco-construction et composant dans les nouveaux matériaux bio-sourcés. Il est même utilisé dans le domaine médical, en particulier dans des soins préconisés lors de chimiothérapie et d'atteinte par le virus HIV (CELC 2015) .

La Figure I.9 résume les principaux domaines d'usage des coproduits du chanvre de nos jours.

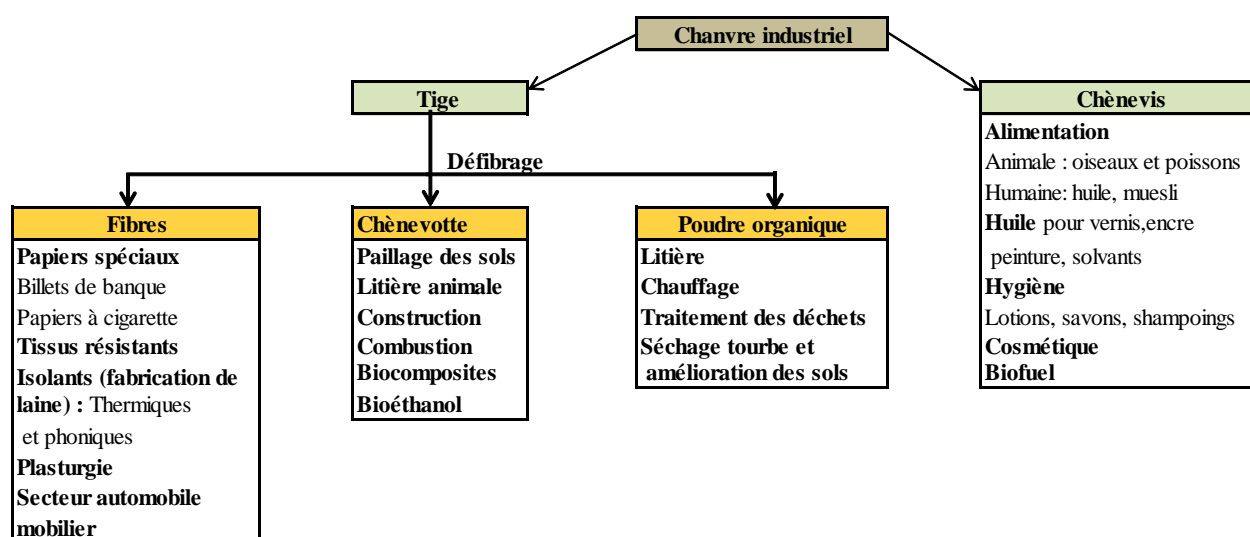


Figure I.9 : Principaux domaines d'usage du chanvre

Pour lutter contre le dilemme « carburant contre nourriture », l'utilisation des terres non agricoles pour la culture de plantes non alimentaires est devenue un enjeu. Le chanvre, tout comme le miscanthus, le lin, le saule et le panic érigé (*switchgrass*), sont de bons candidats (Lavoie et Beauchet 2012). En plus des avantages liés à sa culture, l'intérêt dirigé vers le chanvre s'explique par d'autres caractéristiques. Par exemple, la teneur en lignine dans le chanvre qui est de 16 à 28 %. Cette teneur dépend de la source de la plante et elle est proche de celle trouvée dans le bois et qui est environ de 20 à 29 % selon la source (Correia, Roy, et Goel 2001).

L'intérêt de valorisation revient aussi au fait que le chanvre industriel est l'une des quelques plantes qui produisent des taux élevés d'huile et de biomasse. Ce qui permet alors de l'utiliser pour la production du biocarburant et du bioéthanol (Li *et al.* 2010).

La culture chanvrière résulte en la production de quatre types de matière première, qui ont des applications commerciales distinctes : la graine ou chènevis, la fibre, la chènevotte et la poudre organique issues du défibrage industriel du chanvre (Figure I.10). La paille de chanvre correspond, quant à elle, à l'ensemble de la tige.

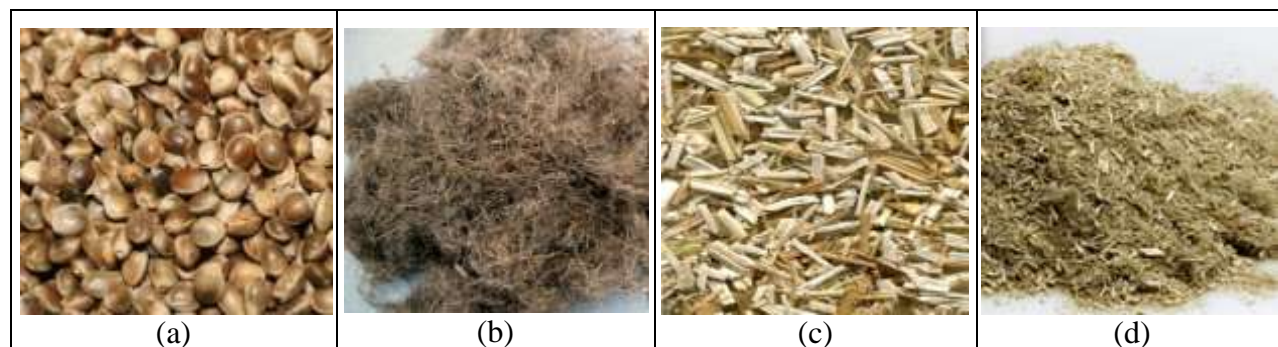


Figure I.10 : Coproduits de l'industrie du chanvre : (a) chènevis, (b) fibres, (c) chènevotte et (d) poudre organique

I.1.2.1. La graine de chanvre ou chènevis

La graine de chanvre, communément appelée chènevis, a une grande valeur nutritive. Elle est riche en vitamines A, C et E, en minéraux (phosphore, potassium, magnésium, soufre, calcium et contient de très faibles quantités de fer et de zinc) et de β -carotène (Orhan, Kusmenoglu, et Sener 2000 ; Callaway 2004). Elle est constituée de 26-38 % d'huile (Kriese *et al.*, Matthäus 2004), 20-25 % de protéines, 20-30 % de glucides et 10-15 % de fibres insolubles (Tang *et al.* 2006).

Contenant plus de 80 % d'acides gras insaturés, l'huile de chènevis est exceptionnellement riche en acide linoléique (Omega-6) (50-70 %) et en acide α -linolénique (Omega-3) (15-34 %) dans un ratio (3 : 1) (Anwar, Latif, et Ashraf 2006). Un exemple de composition en acides gras est donné dans le Tableau I.4.

Tableau I.4 : Pourcentages des acides gras saturés et insaturés contenus dans l'huile de chanvre (Adapté de Li *et al.*, 2010)

Symbole	Acides gras	Huile de chènevis (% massique)	
		Minimum	Maximum
Acides gras saturés		9,3	12,5
C16 : 0	Palmitique	6,0	8,5
C18 : 0	Stéarique	2,5	3,0
C20 : 0	Arachidique	0,5	0,8
Acides gras insaturés		82,0	94,0
C18 : 1	Oléique	12,0	15,0
C18 : 2	Linoléique	52,0	56,0
C18 : 3	α -linolénique	15,5	18,0
C18 : 3	β -linolénique	2,3	3,0

Le tourteau de chanvre, obtenu après extraction de l'huile, renferme environ 15 % de lignine et 40 % de polysaccharides structuraux (cellulose et hémicelluloses). Ces approximations reflètent la composition globale des graines de chanvre (Bouloc 2006 ; Buranov et Mazza 2008).

La polyvalence des graines du chanvre a permis la mise au point, jusqu'à nos jours, de nombreux produits alimentaires, cosmétiques, thérapeutiques (pour l'aromathérapie), et nutraceutiques (Turner, Elsohly, et Boeren 1980 ; Grigoryev 2002 ; Pojić *et al.* 2014).

Autrefois, la graine servait à l'alimentation, aux préparations médicinales et à la fabrication d'huile. Aujourd'hui, en plus de son utilisation pour alimenter les oiseaux et appâter les poissons, la graine trouve des débouchés en nutrition humaine. En effet, elle sert à la production de pâtes, de farine sans gluten (qui se caractérise par un goût de noisette), de la bière et de l'huile. Cette dernière est utilisée pour l'assaisonnement à froid (Callaway 2004 ; EIHA 2015) en raison de sa forte teneur en acides gras polyinsaturés.

En plus de sa valeur nutritive, l'huile de chènevis présente des bienfaits pour la santé (Pierce et Brooks 2000). Elle est employée pour l'abaissement du taux de cholestérol et de l'hypertension (Oomah *et al.* 2002), comme complément alimentaire vu sa teneur en acides gras polyinsaturés (Matthäus et Brühl 2008 ; Latif et Anwar 2009) et pour le traitement de la dermatite atopique chez l'homme (Callaway *et al.* 2005).

A noter que la phase de récolte et le climat juste avant la récolte du chanvre peuvent influencer la qualité de ce produit (Mediavilla et Steinemann 1997).

Majoritairement polyinsaturée, l'huile de chanvre peut être aussi utilisée pour l'éclairage (huile de lampe), l'encre, les peintures, le vernis, la fabrication de produits de préservation du bois,

l'industrie du cuir, les détergents et les savons. En raison de cette fonction et grâce à la présence d'acides α -linoléique, l'huile de chènevis est considérée comme ingrédient idéal pour les produits du soin corporel (les huiles corporelles légères, l'huile de massage, les crèmes enrichies en lipides, les lotions, les produits hydratants et les baumes pour lèvres). Ces produits sont facilement assimilables par les cellules de la peau (Pierce et Brooks 2000 ; Oomah *et al.* 2002).

Li *et al.* (2010) ont montré la possibilité de l'utilisation du chanvre pour la production de biocarburant de très bonne qualité par catalyse en milieu basique de la transestérification de l'huile de chènevis.

Le tourteau de chènevis, quant à lui, peut être écoulé sur les marchés de la consommation animale et humaine. Il contient une grande diversité d'acides aminés incluant les huit acides aminés essentiels chez l'homme, des hydrates de carbone ainsi que certaines quantités d'huile résiduelle (Girouard, Mehdi, et Samson, 1999).

La production de graines qui s'est avérée peu rentable dans le passé en l'absence de marchés à haute valeur ajoutée et /ou spécialisés, semble, au contraire, se développer de nos jours.

Au Canada 36 000 ha (+ 25 %) du chanvre sont cultivés en 2014 pour la production de graines. Cette surface est prévue d'augmenter de 28 % en 2015 et d'atteindre 50 000 ha. 95 % des 18 000 t de graines produites visent le marché des produits alimentaires et en particulier le marché américain (nova-Institut GmbH 2014).

En Europe, la production de graines a atteint 9 000 t en 2013. Contrairement au cas de l'Amérique du nord, 80 % de cette production ont été utilisés comme alimentation pour les poissons et les oiseaux et seulement 20 % étaient destinés pour la production alimentaire (nova-Institut GmbH 2014).

I.1.2.2. Les fibres

Le chanvre industriel comprend trois types de fibres :

- les fibres du bois qui constituent la chènevotte,
- les fibres primaires situées en dehors du système vasculaire,
- les fibres secondaires extra- xylémiennes issues du cambium (Bouloc 2006).

Les fibres primaires sont l'enjeu principal de l'exploitation industrielle.

a. Procédés de défibrage

Transformer le chanvre, c'est « **décortiquer une plante complexe en autant de composantes que possible**. Le métier va donc consister à séparer tous les composants puis à les récupérer pour en tirer le meilleur usage ou plus simplement, séparer la fibre de la chènevotte, plus ou moins l'affiner et récupérer la poudre de chanvre qui résulte du processus » (Bouloc 2006).

Selon l'usage final des fibres (textiles, papier ou à usage technique) les technologies de préparation des fibres c'est-à-dire les processus industriels, vont être totalement différents : rouissage, défibrage (au champ ou en usine) et décortiquage. Les principes de base sont toujours les mêmes (Bouloc 2006).

Le rouissage est l'une des plus vieilles biotechnologies connues. C'est une étape qui consiste à laisser le chanvre sur le lieu de la récolte entre quinze jours et un mois selon les conditions météorologiques et d'effectuer un fanage (retournement) des andains. En effet, l'alternance de rosée, de pluie et d'ensoleillement provoque le rouissage. Ce dernier favorise le développement de micro-organismes (bactéries et champignons) sur les pailles qui vont synthétiser des enzymes capables de dégrader la pectine qui lie les fibres à la partie non fibreuse de la tige. Il permet de séparer les fibres qui deviennent imputrescibles et sans pectine, et n'attireront donc pas les rongeurs ou les mites. Quand la paille atteint un taux d'humidité de 14 à 18 % environ, elle est ramassée, pressée et stockée. Le rouissage entraîne une coloration grisée des pailles mais sans les abimer. Plus on les laisse longtemps au champs, plus leur couleur devient foncée (Botineau 2010 ; Duthon 2014).

La transformation « classique » de la tige de chanvre se fait par défibrage mécanique ou décortiquage. Cette opération consiste à battre et broyer la tige pour en extraire des fibres. Il en résulte deux autres coproduits : la chènevotte et la poussière de chanvre dite poudre organique.

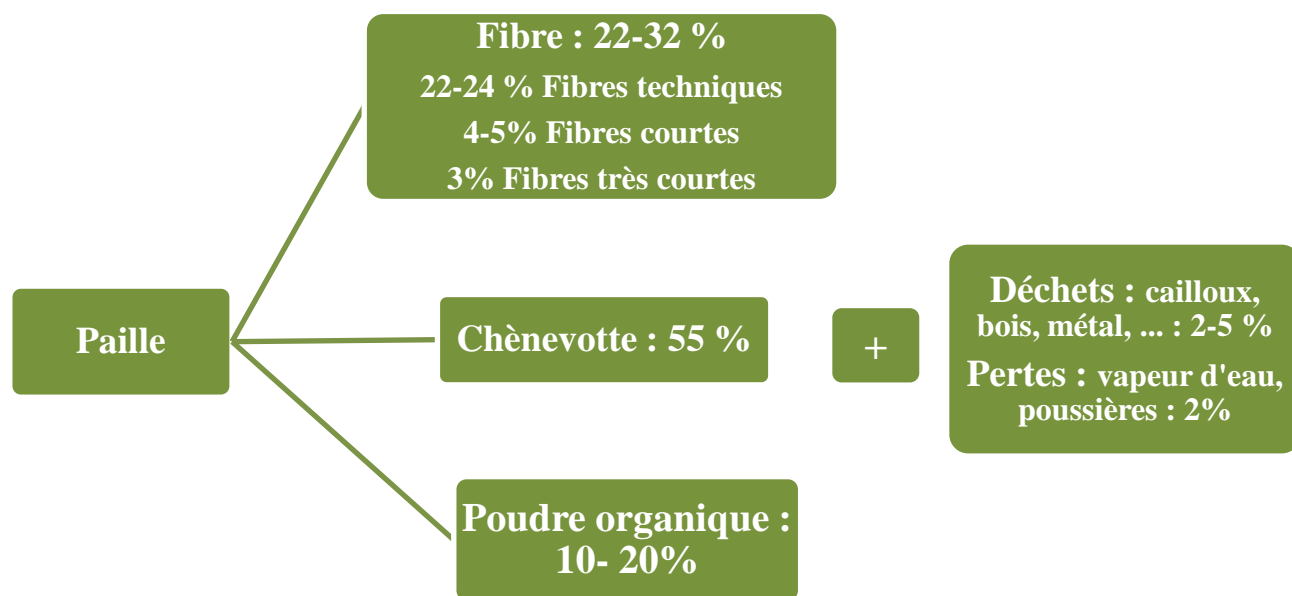


Figure I.11 : Les différents composants de la paille de chanvre et leurs proportions moyennes (Bouloc 2006)

La chènevotte récupérée après défibrage et formée essentiellement de biomasse a été utilisée par (Moxley, Zhu, et Zhang 2008) pour produire par fermentation du carburant à faible teneur en carbone tel que le bioéthanol ou le biobutanol. Ils ont réussi à transformer 96 % du glucose présent dans les résidus (Moxley, Zhu, et Zhang 2008).

A rappeler que le moment et la procédure de récolte diffèrent diamétralement si on vise la production de graines ou de fibres. La récolte uniquement pour la production de fibre s'effectue entre le début et la fin de la floraison, et obligatoirement avant le début du développement du grain. La qualité de la fibre diminue avec le stade de maturité de la plante : les fibres deviennent plus dures et grossières.

b. Utilisation de la fibre

La fibre, appelée aussi filasse, est la composante trouvée dans la périphérie de la tige et représente (selon la source de la plante) 30 à 35 % voire 40 % de la masse sèche totale de la tige (Girouard, Mehdi, et Samson, 1999). La filasse est la fibre longue, de haute qualité du chanvre industriel (Vignon, Garcia-Jaldon, et Dupeyre 1995).

Autrefois utilisées pour la fabrication des cordages et des toiles, les fibres de chanvre sont aujourd'hui utilisées, selon leur qualité, pour la production de vêtements, de tissus résistants et de papiers spéciaux.

Les fibres de qualité inférieure dites « papetières » utilisées sous forme d'étoupes, servent à la fabrication de pâtes à papiers spéciaux. Elles sont valorisées pour papiers fins et résistants, et papiers hauts de gamme (papier extra fin pour faire des livres épais, papiers médicaux, papiers cigarettes, billet de banque...) (Moore 1996 ; Callaway 2004). Les fibres de meilleure qualité dites « techniques » sont utilisées dans la plasturgie et dans la transformation de la laine de chanvre pour les isolations thermique et phonique afin de remplacer la laine minérale ou le polystyrène. Elles sont donc employées pour l'isolation de combles, de planchers, de cloisons, de toitures,...

La production chanvrière spécifiquement à des fins textiles s'est avérée marginale au cours des dernières décennies (Girouard, Mehdi, et Samson, 1999).

Les fibres de chanvre sont aussi employées pour la fabrication de panneaux pour la construction et le mobilier (Papadopoulou *et al.* 2014).

Bien que le chanvre entre aujourd'hui dans de nouvelles applications, l'industrie papetière occupe toujours la majeure partie du marché européen (55 % en 2014 contre 95 % avant les années 1990), les fibres étant fournies principalement par les producteurs français (Figure I.12). Leur application comme matériaux d'isolation occupe la deuxième plus importante partie du marché (26 %). Les biocomposites occupent 15 % du marché dont 96 % pour les applications automobiles d'intérieur. Ceci correspond à plus de 3 700 tonnes de fibres de chanvre ou environ 7 500 tonnes de biocomposites (le contenu en fibres naturelles varie entre 30 et 70 %). Le marché des biocomposites pour des applications d'habitable automobile est en croissance. Ces biocomposites sont utilisés entre autres pour la fabrication de tableaux de bord, d'intérieurs de portières, ou de garnitures de coffres.

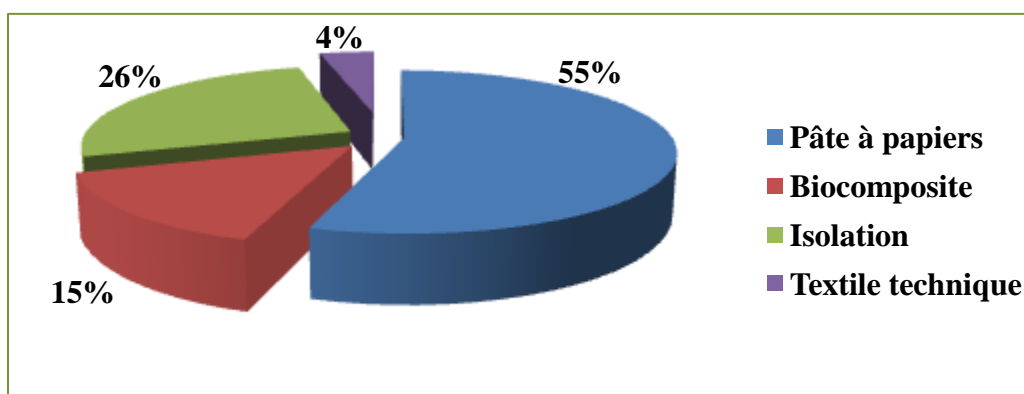


Figure I.12 : Applications des fibres de chanvre dans le marché européen en 2014 (EIHA 2015)

c. Coproduits

– Chènevotte

La chènevotte (« *woody hemp* » en anglais) est le cœur de la tige et se situe sous l'écorce. Elle représente 50 à 55 % de la masse sèche de la tige selon les références (Vignon, Garcia-Jaldon, et Dupeyre 1995 ; Girouard, Mehdi, et Samson, 1999) et peut atteindre 70 % (Bag *et al.* 2011).

La chènevotte a une capacité d'absorption et de rétention d'eau importante. Elle peut absorber jusqu'à quatre fois son poids en eau. Elle est employée en litière à la fois pour les animaux domestiques (chats, lapins) et pour les chevaux ; pour le paillage des sols ; et dans la construction (Shea, Lawrence, et Walker 2012) grâce à sa légèreté et son caractère isolant. Le béton de chanvre qui est un mélange de chènevotte, d'un liant à base de chaux et d'eau, trouve ses applications dans les dallages isolants, les chapes d'égalisation sur plancher, l'isolation des toitures, le remplissage des murs, les murs banchés et les blocs préfabriqués (Nguyen 2010).

La chènevotte peut être transformée en briquettes ou pellets et utilisée comme matière première pour la production d'énergie.

La combinaison de composés lignocellulosiques comme la chènevotte, le lin ou le kenaf aux polymères thermoplastiques tel que le polypropylène permet non seulement d'augmenter leur biodégradabilité mais modifie également leur inflammabilité. Ces composites sont de plus en plus utilisés dans l'industrie automobile et dans la construction pour leurs propriétés de résistance au feu (Papadopoulou *et al.* 2014).

Dans des études visant à l'usage de biocarburant, la chènevotte a également été étudiée pour la production d'éthanol (González-García *et al.* 2012).

L'utilisation de la chènevotte comme litière pour animaux occupe 67 % du marché (Figure I.13). Le béton de chanvre est en constante croissance. Ce matériau est facile à manipuler : il a un prix compétitif, il montre de bonnes propriétés d'isolation comme matériau de construction. Il semble avoir un grand potentiel pour l'éco-construction. Le béton de chanvre occupe aujourd'hui 15 % du marché. Ses applications se trouvent surtout en France, au Royaume-Uni et en Irlande. La chènevotte est aussi utilisée pour la fabrication des panneaux de faible densité ou comme combustible, ... (EIHA 2015).

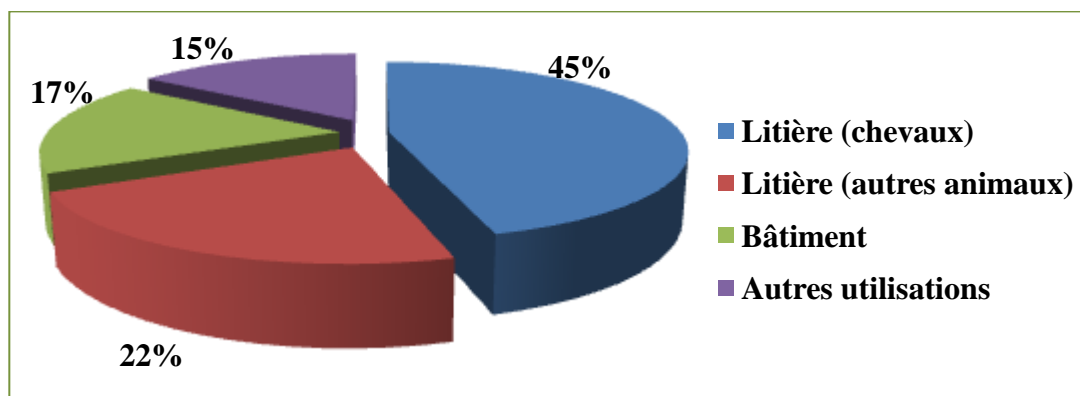


Figure I.13 : Marchés européens de la chènevotte sur la récolte 2010 (44 000 tonnes) (EIHA 2015)

– Poudre organique

Sous forme de poudre, elle est extraite par aspiration tout au long de la ligne de défibrage du chanvre. Elle représente environ 20 % du poids de la paille (www.chanvre.oxatis.com, 2015).

Elle correspond pour partie à toutes les matières qui ne composent ni la fibre ni la chènevotte, c'est-à-dire aux liants végétaux, comme la pectine, qui assurent la cohésion de la tige, et pour partie aux particules de fibre et de chènevotte issues du défibrage.

La poudre est ainsi constituée de produits organiques et minéraux pulvérulents et de micro fibrilles (Bouloc 2006).

Vu son fort pouvoir absorbant, elle présente une excellente matière pour la litière. Elle trouve aussi son application dans le séchage de la tourbe.

La poudre organique est un combustible. Elle est employée dans l'alimentation de poêles et de chaudières. Elle est aussi utilisée comme un amendement organique et comme un auxiliaire technique pour le traitement de déchets *i.e.* traitement des boues des stations d'épuration et fabrication de compost en le mélangeant respectivement avec les boues et les déchets verts (www.chanvre.oxatis.com, 2015).

I.1.3. Les coproduits du chanvre : une source potentielle de composés bioactifs

Avec l'épuisement des combustibles fossiles, il est attendu que les carburants, les produits chimiques, et l'énergie soient fournis par des ressources renouvelables comme la biomasse. Selon cette vision, l'Union Européenne dans son ensemble s'est fixée un objectif obligatoire, d'ici 2020, de produire 20 % de la consommation énergétique à partir des énergies renouvelables. Un grand intérêt a été alors attribué au développement de la technologie et des procédés de valorisation de la biomasse (Zakzeski *et al.* 2010).

Dans ce but, l'agrochimie s'est dirigée vers la valorisation des co et sous-produits issus des industries de transformation des productions végétales en tant que sources de molécules à haute valeur ajoutée. La chènevotte et la poudre organique issues du procédé de défibrage du chanvre pourraient devenir une source de molécules d'intérêt. Les composés ciblés sont les monomères aromatiques présents dans les parois cellulaires de la plante et plus particulièrement dans la partie lignocellulosique. Ces composés trouvent leurs applications dans le domaine alimentaire, cosmétique et pharmaceutique.

Le chanvre, une matière lignocellulosique, représente à ce titre une matière végétale valorisable. Dégradée, la matière lignocellulosique est séparée en ses différents composants valorisables : sucres (cellulose, hémicelluloses, amidon et pectine), lignine, protéines, huiles et phénols.

Les teneurs en lignine dans les coproduits du chanvre (la chènevotte et la poudre organique) c'est-à-dire dans les résidus lignocellulosiques de la plante, sont élevées et relativement proches de celle du bois.

Une présentation de la structure chimique de la matière végétale est une étape nécessaire à la connaissance de la composition de la matière végétale et à la compréhension des méthodes de valorisation et des technologies qui y sont associées.

I.1.3.1. Localisation et structure chimique des principaux constituants

Les principaux constituants chimiques des parois végétales sont : la cellulose, les hémicelluloses et la lignine et forment ensemble la lignocellulose aussi appelée la structure lignocellulosique (Gruber, Kamm, et Kamm 2006). D'autres composés polymériques sont présents en plus faibles

quantités comme les pectines et les protéines. En plus de ces composés macromoléculaires, de nombreuses matières extractibles peuvent être présentes comme les minéraux, les huiles et les phénols (Figure I.14). Les proportions de ces divers constituants dans la paroi végétale dépendent du stade de croissance et de maturité de la plante, des cultivars et variétés du plant, et des facteurs écophysiologiques qui conditionnent la croissance et le développement de la plante (Bouloc 2006).

I.1.3.1.1. Cellulose et hémicelluloses

La cellulose est un homopolymère constitué d'une chaîne de molécules de glucose liées entre elles par des liaisons de types β 1-4. Rassemblées en microfibrilles, les chaînes de glucose représentent une alternance de zones cristallines et amorphes. Le degré de cristallinité de la cellulose est moins important dans la paroi primaire que dans la paroi secondaire de la cellule végétale. Les microfibrilles sont ensuite agglomérées en fibrilles puis en fibres de celluloses. La structure de la cellulose apporte à la paroi élasticité et résistance à la traction.

Les fibres de chanvre sont particulièrement riches en cellulose cristalline (60 à 80 %). Les propriétés de la cellulose sont influencées par le stress mécanique subi par la plante lors de sa croissance et aussi par les méthodes d'extraction des fibres (Bonatti *et al.* 2004 ; Bouloc 2006).

Second polymère d'origine naturelle par ordre d'abondance dans la nature, après la cellulose, les hémicelluloses ou glycanes sont des polysaccharides hétérogènes. Elles représentent jusqu'à 25 à 30 % en masse sèche de la biomasse lignocellulosique. Elles sont localisées dans les parois cellulaires de la plante. Leur structure diffère selon qu'elles appartiennent aux parois primaire ou secondaire et selon les groupes systématiques ou types de plante : conifères, mono- ou dicotylédones (Guignard et Potier 2000 ; Bouloc 2006).

Dans le chanvre, comme dans tous les dicotylédones, on retrouve principalement les xyloglucanes (dans les parois primaires) ainsi que les glucuronoxylanes et une faible proportion d'arabinose (dans les parois secondaires) (Crônier, Monties, et Chabbert 2005 ; Bouloc 2006).

Les hémicelluloses susceptibles de former des liaisons covalentes avec la lignine jouent un rôle important dans le maintien de la structure pariétale et donc l'intégrité des tissus de la plante (Stevanovic et Perrin 2009).

I.1.3.1.2. Lignine

La lignine est l'un des plus abondants polymères naturels présents dans la nature avec la cellulose et les hémicelluloses (Amen-Chen, Pakdel, et Roy 2001 ; Holladay *et al.* 2007 ; Buranov et Mazza 2008 ; Zakzeski *et al.* 2010). Les lignines et les celluloses forment ensemble 60 à 80 % de la biomasse terrestre (Guignard et Potier 2000).

Les lignines, du latin « *lignum* » signifiant « bois », sont des substances non glucidiques qui se déposent à la fin de la formation des parois primaires et secondaires, dans certaines cellules végétales comme dans les vaisseaux du bois ou encore dans les cellules scléreuses (Guignard et Potier 2000).

La lignine, ayant une couleur jaune ou jaune-brun, représente un constituant principal de la biomasse lignocellulosique (15 à 30 % en masse et 40 % de la fraction supposé être disponible pour la production de la bioénergie) (Guignard et Potier 2000 ; Holladay *et al.* 2007 ; Buranov et Mazza 2008 ; Zakzeski *et al.* 2010). Elle est connue sous deux formes : la « lignine native » *i.e.* la lignine telle qu'elle se trouve dans la nature très difficile à étudier ; et la « lignine technique » obtenue suite aux procédés de transformation de la biomasse (Holladay *et al.* 2007).

En ce qui concerne sa valorisation, la lignine a reçu peu d'attention comparée à la cellulose. Par conséquent, seulement 2 % environ des lignines disponibles de l'industrie des pâtes à papiers sont utilisés dans le commerce (composant dans les liants ou additif au ciment). Le reste est utilisé comme combustible de faible valeur pour la production de chaleur (Gruber, Kamm, et Kamm 2006 ; Haveren, Scott, et Sanders 2008 ; Zakzeski *et al.* 2010). Cependant, la lignine est une source potentielle également pour la production de produits chimiques, particulièrement des composés aromatiques par conversion catalytique, biologique ou thermochimique (Amen-Chen, Pakdel, et Roy 2001 ; Bozell 2008 ; Linger *et al.* 2014).

Dans la paroi des cellules végétales, la lignine remplit les espaces entre la cellulose et l'hémicellulose, et elle agit comme une résine qui maintient la matrice lignocellulosique. Elle confère la force, la flexibilité et la rigidité au système par sa liaison avec les polymères glucidiques. Aussi elle fournit le transfert interne de l'eau et des nutriments et la protection contre les attaques par les microorganismes (Gruber, Kamm, et Kamm 2006 ; Holladay *et al.* 2007 ; Buranov et Mazza 2008 ; Zakzeski *et al.* 2010).

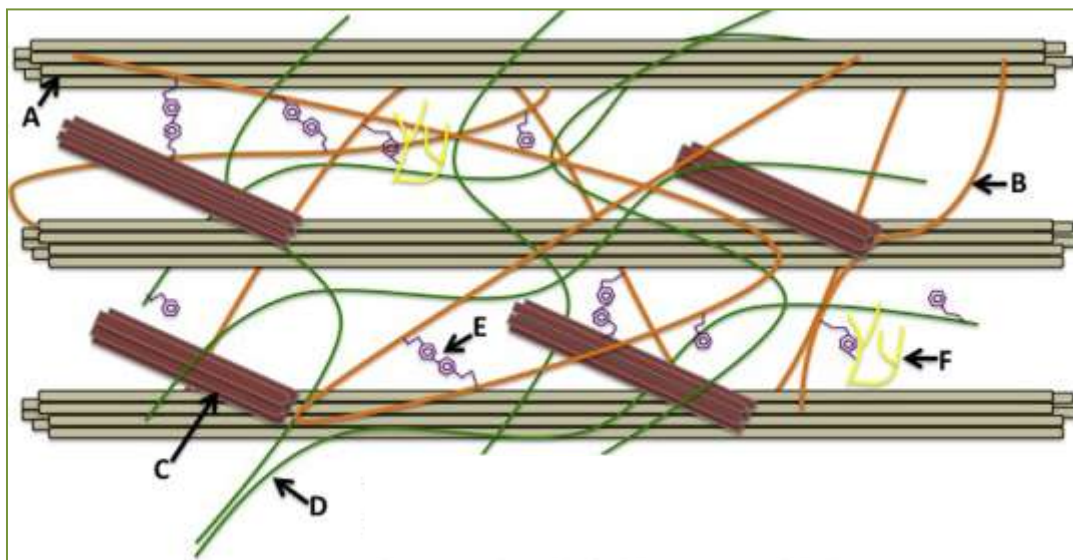


Figure I.14 : Représentation schématique de l'architecture d'une paroi cellulaire, mettant en évidence l'emplacement de lignine au sein des polymères de cellulose et d'hémicelluloses (A) cellulose, (B) hémicelluloses, (C) protéines structurales, (D) pectines, (E) acides phénoliques (F) lignine. (Acosta-Estrada, Gutiérrez-Urbe, et Serna-Saldívar 2014)

L'abondance de la lignine est différente selon le type de la plante. Elle est plus abondante dans le bois tendre (ou *softwood*) et moins abondante dans les graminées (ou *grasses*). D'autre part, elle dépend également de la source de la biomasse pour un même type de plante (Tableau I.5)

Tableau I. 5 : Variation de la quantité de lignine en fonction du type de la plante et de la fraction étudiée

Source	Pourcentage de lignine	Références
Bois tendre	27-33	(Holladay <i>et al.</i> 2007)
Bois dur	18-25	
Graminées	17-24	
Canne de maïs	15-21	(Buranov et Mazza 2008)
Paille de blé	5-17	
Paille de riz	8-19	
Paille de lin	23	
Paille de chanvre	6,8	(Godin <i>et al.</i> 2010)
Fibres de lin	5	(del Rio <i>et al.</i> 2011)
Ana de lin	20-30 23-31	(Kim et Mazza 2007) (del Rio <i>et al.</i> 2011)
Fibres de chanvre	2 4,6	(Crônier, Monties, et Chabbert 2005) (del Rio <i>et al.</i> 2011)
Chènevotte	28	(Vignon, Garcia-Jaldon, et Dupeyre 1995)
Chènevotte	23	(Gandolfi <i>et al.</i> 2013)

En plus de la quantité de lignine, la composition, le poids moléculaire, la solubilité, la réactivité, et le nombre de groupes phénoliques, hydroxyles et carboxyliques diffèrent d'une plante à l'autre et aussi d'une espèce à l'autre (Gruber, Kamm, et Kamm 2006 ; Holladay *et al.* 2007 ; Buranov et Mazza 2008 ; Zakzeski *et al.* 2010).

La lignine est le seul constituant de la biomasse comportant des unités aromatiques (Buranov et Mazza 2008). Sa structure est complexe et varie en fonction de la source de la biomasse et de la technique d'isolement (Holladay *et al.* 2007).

Les lignines des graminées sont des polymères amorphes tridimensionnels constitués d'unités de phénylpropenyl C9 (C6-C3) (Figure I.15) et représentent les monolignols précurseurs : alcool *p*-coumarylique, coniférylique et sinapylique (Zakzeski *et al.* 2010).

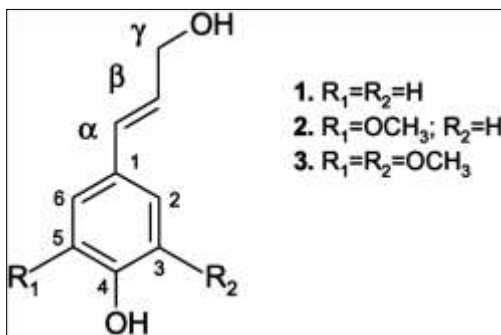


Figure I.15 : Présentation du motif de base des lignines de type phénylpropane C9 (C6-C3), et de ses dérivés monolignols : alcools *p*-coumarylique (1), coniférylique (2), sinapylique (3)

Les unités constitutives de ces alcools dans le polymère sont, respectivement, les unités *p*-hydroxyphényle (H), gaïacyle (G) et syringyle (S) (Figure I.16) distinctes par leur degré de méthylation du noyau aromatique. Elles sont liées par des liaisons carbone-carbone et carbone-oxygène (liaison éther) (Gruber, Kamm, et Kamm 2006 ; Holladay *et al.* 2007 ; Buranov et Mazza 2008 ; Zakzeski *et al.* 2010).

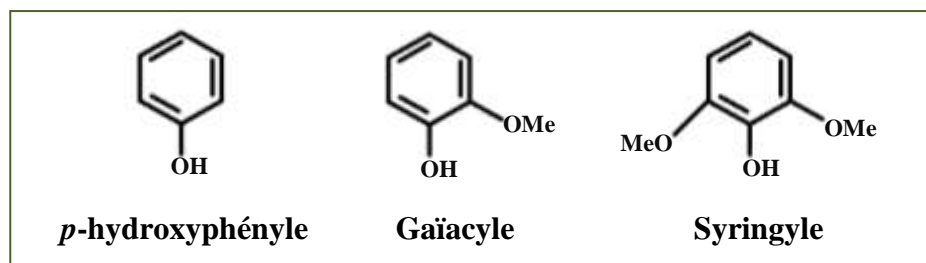


Figure I. 16 : Les unités composant les structures du phénylpropenyl

Les proportions de ces unités phénylpropane dépendent de la source de la lignine donc du type de matière végétale (Tableau I.6). Elle est relativement constante pour chaque paille de graminée avec un rapport molaire caractéristique S/G proche de 1 (Lapierre 1993 ; Del Rio *et al.* 2009).

Tableau I.6 : Composition de la lignine selon la source de la biomasse (Lapierre 1993 ; Del Rio *et al.* 2009)

Source	Composition ou Ratio G/S/H
Bois tendre	Unités gäiacyle (G)
Bois dur	Unités gäiacyle (G) et sinapyle (S)
Graminées	Unités gäiacyle (G) et syringyle (S) et <i>p</i> -hydroxyphényle
Paille de blé	45/46/9
Paille de riz	45/40/15
Chanvre	51/40/9
Lin	67/29/4
Jute	36/62/2

La liaison β -O-4 est la plus dominante, (Figure I.17) composant plus de la moitié des liaisons de la structure de la lignine (> 58 %). Cela peut être expliqué par le faible encombrement stérique sur le carbone β (Amen-Chen, Pakdel, et Roy 2001 ; Zakzeski *et al.* 2010).

Le polymère amorphe tridimensionnel peut être constitué d'une douzaine de liaisons inter-monomériques différentes mais sa structure complexe reste très mal décrite dans le cas du chanvre.

Les 9/10^{ème} du total des lignines composant les tiges de chanvre sont retrouvés dans les cellules de la chènevotte (du bois de chanvre). Les fibres primaires sont par conséquent très peu lignifiées.

D'autre part, la lignine est toujours associée aux sucres (en particulier aux hémicelluloses) par des liaisons covalentes sur les deux sites : α -carbone et C-4 du cycle benzénique, et cette association forme un complexe lignocellulosique nommé « *lignin-carbohydrate complexes* » LCC (Buranov et Mazza 2008). Ce complexe comprend en plus des polyosides, des acides hydroxycinnamiques, plus particulièrement des acides férulique (AF) et *p*-coumarique (ApC) chez les graminées et des aldéhydes phénoliques (Figure I.18).

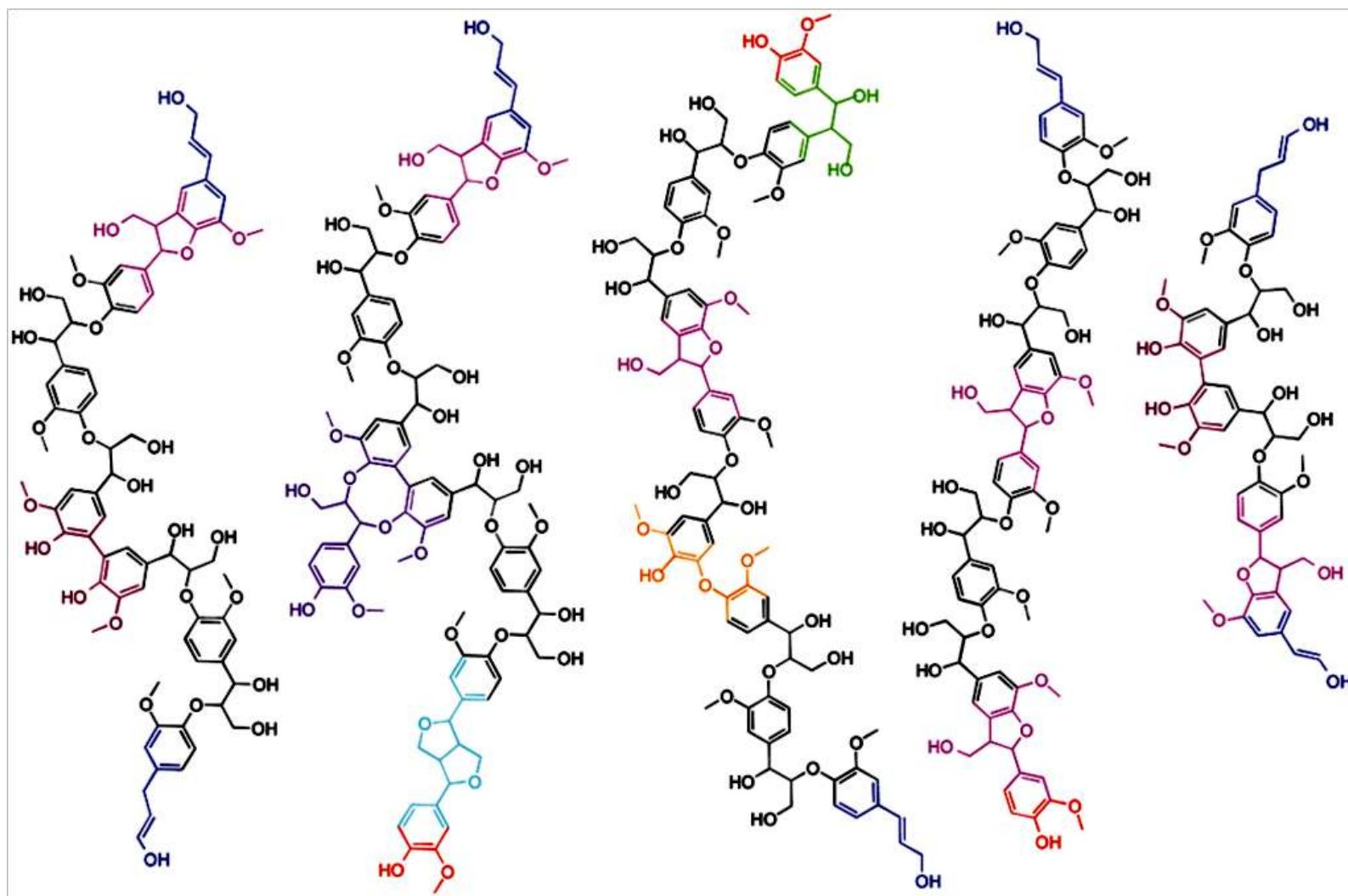


Figure I.17 : Présentation de différents types de liaisons se trouvant dans la structure de la lignine. β -O-4' marquée en noir, β -5' en rose, DBDO (dibenzodioxocine 5-5, β -O-4 et α -O-4) en mauve, 5-5' en amarante, β - β ' en azur, β -O-5' en orange, chaîne aliphatique terminale en bleu et terminaison phénolique OH en rouge (adaptée à partir de (Banoub et al. 2015))

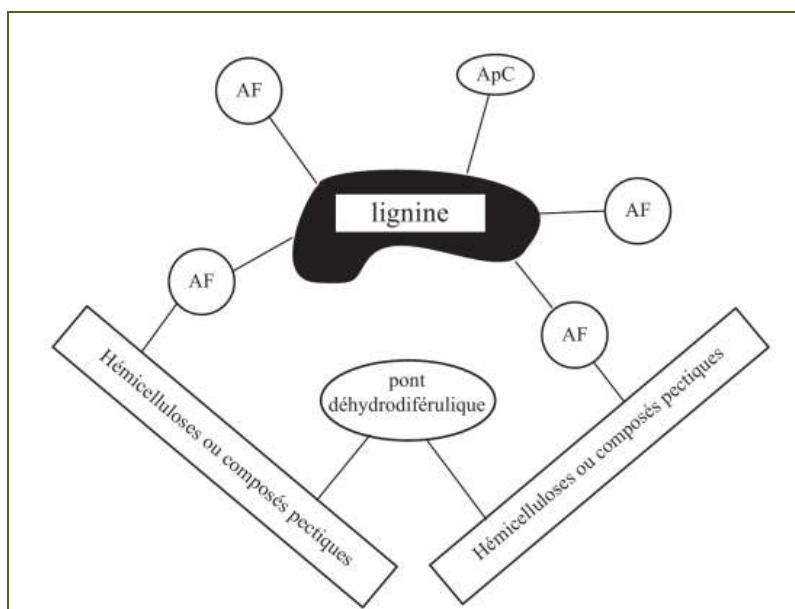


Figure I.18 : Présentation schématique du complexe lignine-hémicelluloses (Macheix, Fleuriot, et Jay-Allemand 2005)

I.1.3.2. Acides phénoliques

Les acides phénoliques dans la matière végétale sont désignés fréquemment par le terme « polyphénols ». Ils sont des composés organiques possédant un hydroxyle phénolique et au moins une fonction carboxylique. Ils appartiennent comme les terpènes et les alcaloïdes au groupe des métabolites secondaires. Les propriétés antioxydantes de ces composés, leur abondance dans les aliments, et leur rôle dans la prévention de diverses maladies associées au stress oxydatif telles que le cancer et les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, sont à l'origine de l'intérêt croissant porté à cette famille de molécules depuis ces dix dernières années (Manach *et al.* 2004).

Les composés phénoliques sont classés en différentes familles en fonction du nombre de cycles phénoliques qu'ils contiennent et des éléments structuraux qui les lient les uns aux autres (Collin et Crouzet 2011) (Figure I.19).

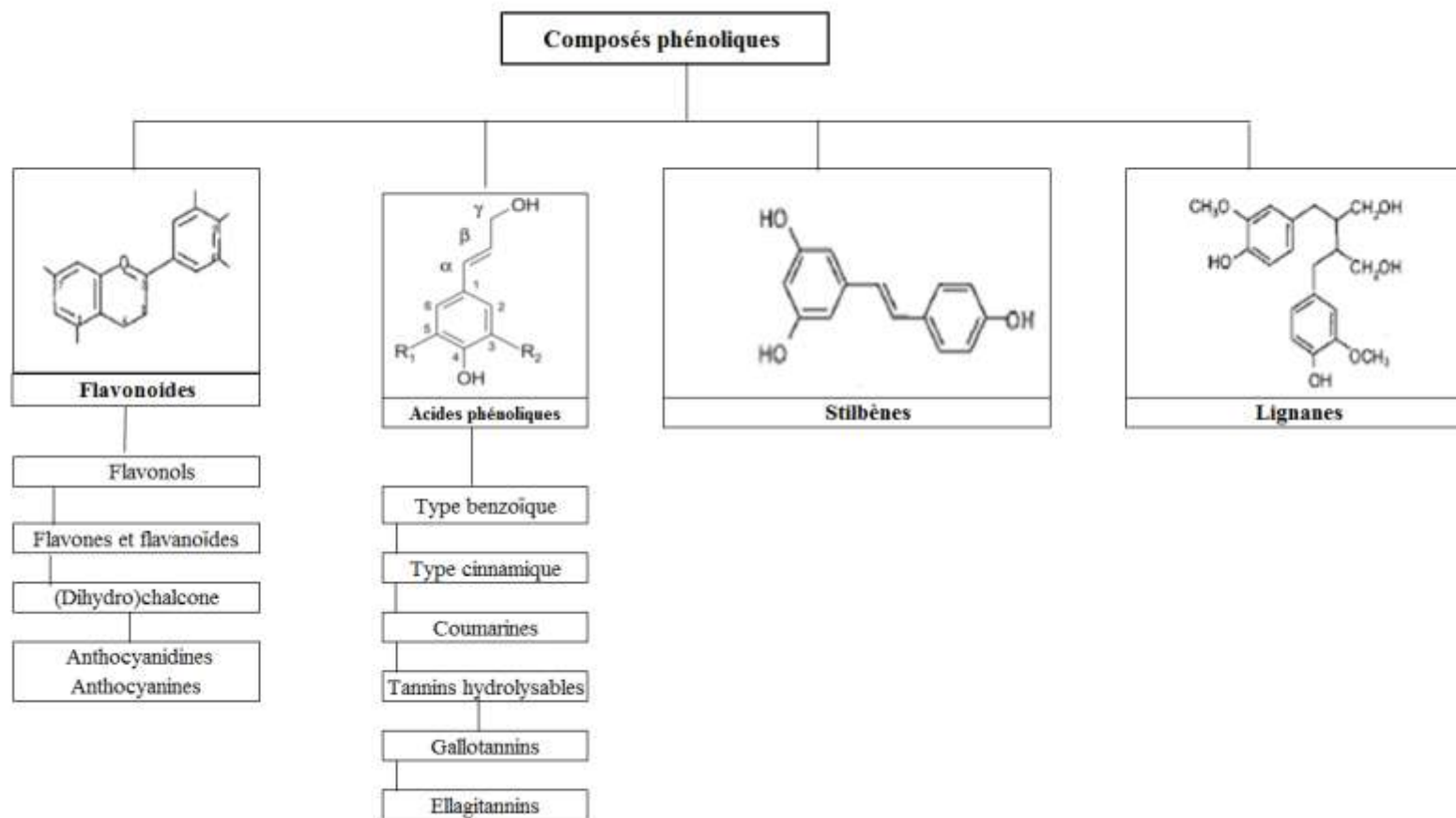
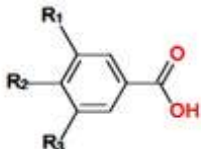
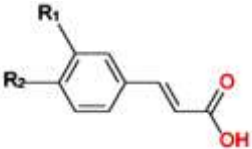


Figure I.19 : Les différentes familles de composés phénoliques rencontrées dans le règne végétal (Collin et Crouzet 2011)

Les acides phénoliques sont des monophénols ce qui les différencie des flavonoïdes, stilbènes, et lignanes. Deux classes d'acides phénoliques sont les plus répandues : les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique (Manach *et al.* 2004) (Tableau I.7).

Tableau I.7 : Structures chimiques des acides phénoliques (Macheix, Fleuriet, et Jay-Allemand 2005)

	Acides hydroxybenzoïques	Acides hydroxycinnamiques (ou phénylpropanoïdes)
Structure chimique		
Les principaux acides	$R_1 = R_3 = H ; R_2 = OH$: Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque $R_1 = R_2 = R_3 = OH$: Acide gallique $R_1 = R_2 = OH ; R_3 = H$: Acide protocatéchuique $R_1 = H ; R_2 = OH ; R_3 = OCH_3$: Acide vanillique $R_1 = R_3 = OCH_3 ; R_2 = OH$: Acide syringique	$R_1 = R_2 = H$: Acide cinnamique $R_1 = OH ; R_2 = H$: Acide coumarique $R_1 = R_2 = OH$: Acide caféique $R_1 = OCH_3 ; R_2 = OH$: Acide férulique

Les acides hydroxycinnamiques sont plus couramment trouvés dans les parois cellulaires de la matière végétale surtout les acides *p*-coumarique, caféique, férulique (ou acide 3-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)prop-2-énoïque ou acide 4-hydroxy-3-méthoxycinnamique) et sinapique. Ces acides sont rarement présents sous forme libre. Ils représentent 3 % de la matière sèche des parois des graminées (Saulnier *et al.* 1999).

L'acide caféique est généralement le plus abondant chez les végétaux. Il est très abondant dans les fruits et représente 75-100 % de la teneur totale en acides hydroxycinnamiques (Manach *et al.* 2004). L'acide chlorogénique est l'acide le plus rencontré dans la pomme et le café (Macheix, Fleuriet, et Jay-Allemand 2005).

L'acide férulique quant à lui est l'acide phénolique le plus abondant dans les céréales. Par exemple, dans les graines de blé, il représente 90 % des polyphénols totaux (0,8-2 g/kg masse sèche) (Sosulski, Krygier, et Hogge 1982 ; Lempereur, Rouau, et Abecassis 1997). En plus de l'acide férulique, on trouve aussi dans les céréales d'autres composés phénoliques ; par exemple dans les fibres de maïs et le son de blé, on trouve de faibles quantités d'acides sinapique et *p*-coumarique (Gallardo, Jimenez, et Garcia-Conesa 2006) et dans le riz on trouve les acides férulique, *p*-coumarique et le ferulate (Adom et Liu 2002).

La lignine extraite des graminées conduit à la production de molécules valorisables au niveau industriel et alimentaire telles que la vanilline, l'acide férulique, le gaïacol de vinyle et les lignanes optiquement actifs, et les dimères des monolignols (Buranov et Mazza 2008).

A noter qu'à ce jour, le rendement le plus élevé en phénols obtenu à partir de la lignine est de 5 à 10 %. Les processus appliqués étant en évolution, le fractionnement des éléments constitutifs de la structure de la lignine et le développement de méthode efficace pour la production du bioéthanol à partir des sucres restent des études à long terme (Haveren, Scott, et Sanders 2008).

I.1.3.2.1. Association des acides férulique et coumarique avec la lignine et les polysaccharides pariétaux

Les acides hydroxycinnamiques sont attachés à la lignine et aux hémicelluloses par des liaisons esters et éthers. Ces acides hydroxycinnamiques sont l'acide *p*-coumarique et l'acide férulique dans le cas des herbacées. Le type de l'acide est déterminé par rapport aux monomères présents dans la plante et formés suite à l'étape de lignification de cette dernière (Kim et Mazza 2006 ; Buranov et Mazza 2008).

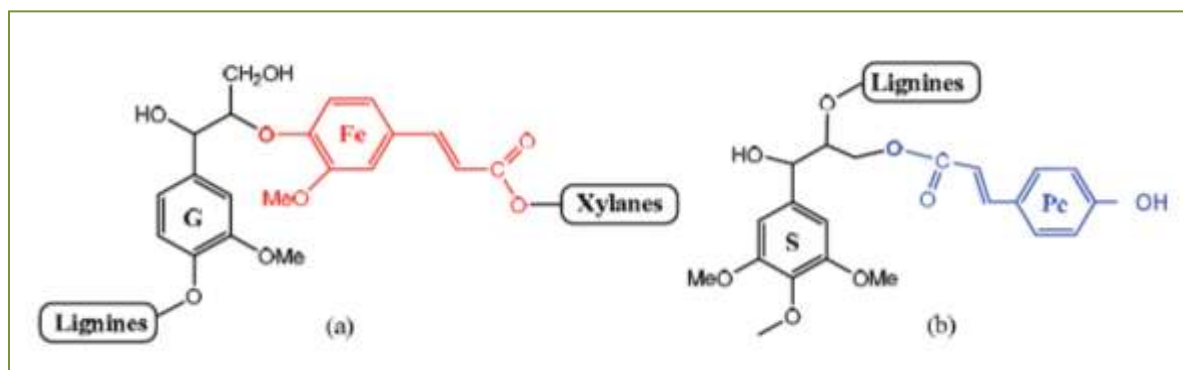


Figure 1.20 : Principales structures liant les lignines aux acides *p*-hydroxycinnamiques Pc et Fe identifiées au sein des parois de graminées. (a) Ester férulique lié par une liaison éther de type β-O-4 avec une unité G et (b) acide *p*-coumarique estérifié en position γ de la chaîne latérale d'une unité S (Zheng 2011)

Les acides hydroxycinnamiques sont liés aux arabinoxyldes par des liaisons esters et à la lignine par des liaisons esters et éthers. Les auteurs Cornu *et al.* (1994) ont montré que l'acide férulique est essentiellement lié à la lignine par des liaisons éthers alors que l'acide *p*-coumarique est

surtout lié à la lignine par des liaisons esters. L'acide férulique est associé aux polysaccharides par son groupe carboxylique et à la lignine (initialement à l'alcool coniférylique et à l'acide sinapylique) par son noyau aromatique.

On peut le trouver aussi sous la forme de dimères formant des ponts entre les chaînes d'hémicellulose (Manach *et al.* 2004) (Figure I.18).

Dans les graminées, l'acide *p*-coumarique estérifie les unités syringyles des lignines alors que l'acide férulique forme des liaisons éthers et sert d'ancrage aux hémicelluloses.

Dans les dicotylédones, les acides férulique et *p*-coumarique sont principalement associés à la fraction pectique et sont environ 10 fois moins abondants que dans les graminées. La rareté de ces acides phénoliques suggère pour la lignine d'autres types de liaisons comme par exemple la coexistence d'esters avec des éthers ou des glycosides comme dans le cas du bois de tremble (Cornu *et al.* 1994 ; Barberousse *et al.* 2008 ; Buranov et Mazza 2008 ; Buranov et Mazza 2009).

I.1.3.2.2. Les débouchés pour les acides phénoliques et leurs dérivés/ bioactivité

Les acides phénoliques sont les précurseurs de la lignine et ils jouent un rôle crucial dans la résistance de la plante aux maladies et infections. Les composés phénoliques sont directement impliqués dans divers processus physiologiques ainsi que dans des mécanismes de défense des plantes contre les infections microbiennes et les attaques des parasites (Adeboye, Bettiga, et Olsson 2014).

Lors de la conversion de la biomasse en biocarburant et suite à l'étape de prétraitement de la biomasse, des composés phénoliques provenant de la lignine et présents dans l'hydrolysate, ont un rôle négatif et inhibent l'hydrolyse enzymatique et l'hydrolyse des polysaccharides (Zeng *et al.* 2014).

La propriété la plus importante de la plupart des composés phénoliques est leur activité antioxydante (Gonçalves, Dinis, et Batista 2005). En plus de leur capacité à donner un hydrogène ou des électrons, ils sont des intermédiaires radicalaires stables (Maillard *et al.* 1996).

Les acides phénoliques tels que les acides caféique, coumarique, férulique et protocatéchique présentent certains effets antifongiques (Sterbova *et al.* 2004).

L'acide férulique comme la plupart des acides phénoliques, est un antioxydant (S Ou, Li, et Gao 1999 ; Quan, Sun, et Qu 2009). Il présente aussi des activités physiologiques telles que (i) antimicrobienne et anti-inflammatoire (Akihisa *et al.* 2000), (ii) anticancéreuse (Mori *et al.* 1998), (iii) diminution du cholestérol (Wilson *et al.* 2007) et (iv) prévention de la thrombose et de l'athérosclérose (Kayahara, Miao, et Fujiwara 1998). Des études ont montré que l'acide férulique pourrait inhiber le malondialdéhyde (MDA) produit à partir des plaquettes, la lyse érythrocytaire induite par le MDA, et le radical hydroxyle et l'oxydation des lipides induite par H_2O_2 et O^- (Sun *et al.* 2006 ; Quan, Sun, et Qu 2009).

Des études pharmacologiques ont trouvé aussi que l'acide férulique ainsi que le férulate de sodium peuvent inhiber l'agrégation plaquettaire et détendre ou stimuler le muscle lisse (Lu *et al.* 2005). Ils possèdent aussi des effets antiaritmique et immunostimulant.

L'acide férulique est connu pour des effets bénéfiques tels que la protection contre des maladies coronaires (augmenter le flux sanguin coronaire) et l'augmentation de la viabilité du sperme (Shiyi Ou et Kwok 2004).

Dans le domaine alimentaire, il est actuellement utilisé comme conservateur en raison de ses propriétés antioxydantes et de ses actions antimicrobiennes (Micard et Thibault 1999 ; Oosterveld *et al.* 2001).

L'acide férulique a la capacité d'agir comme un inhibiteur de la peroxydation des acides gras et comme absorbeur de rayons UV (Graf 1992). Il est par conséquent utilisé en tant que constituant photoprotecteur dans de nombreuses lotions pour la peau et dans des écrans solaires (Saija *et al.* 2000).

En outre, il y a un intérêt croissant pour l'utilisation potentielle de l'acide férulique comme matière première pour sa conversion biocatalytique en molécules à haute valeur telles que des polymères, les styrènes, les époxydes, les alkylbenzènes, la vanilline et les dérivés de l'acide vanillique, guaïacol, catéchol et acide protocatéchique (Rosazza 1995 ; Tang *et al.* 2014).

L'acide *p*-coumarique montre des activités antioxydantes et antimicrobiennes et joue un rôle important dans la santé humaine (Boz, 2015).

En tant qu'antioxydant, il diminue la peroxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL) (Roginsky et Lissi, 2005). En plus, étant un agent réducteur et possédant des fonctionnalités de piégeage de radicaux libres, il présente une grande importance dans la prévention ou le contrôle

de nombreuses maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires et le cancer (Boz, 2015 ; Vlase *et al.*, 2014).

Ayant une activité antimicrobienne, les ApC sont signalés à avoir plus d'influence contre les bactéries à Gram négatif (*E. coli*, *Salmonella*) plutôt que de bactéries Gram-positives (*Bacillus*, *Clostridium* et *Listeria*) (Cetin-Karaca, 2011) ; plusieurs exemples ont été cités dans la revue de Boz (Boz, 2015). Il est aussi constaté que l'effet antimicrobien des ApC augmente par une réduction de la valeur du pH. Cet effet est similaire à ce qui est observé dans le cas des acides férulique et caféique (Sanchez-Maldonado *et al.*, 2011).

A noter que l'ApC peut se transformer en *p*-hydroxybenzaldéhyde au cours du traitement thermique (Ragee *et al.*, 2014).

La vanilline est obtenue à partir de l'acide férulique ou des unités gaïacol. Elle est largement utilisée par l'industrie alimentaire pour son arôme. Elle est aussi utilisée comme matière première par l'industrie pharmaceutique pour la synthèse de médicaments tels que la L-DOPA et le méthyle L-DOPA (Buranov et Mazza 2009).

L'intérêt croissant que suscitent les composés phénoliques vient des effets bénéfiques qu'ils présentent. De nombreuses applications importantes existent et sont en cours de développement dans les domaines alimentaires, agroalimentaires, cosmétiques, pharmaceutiques et médicaux.

La disponibilité du chanvre sur le marché, actuellement en croissance, et surtout en France présente un avantage majeur pour explorer les voies d'extraction et de valorisation des acides phénoliques.

I.1.3.3. Autres constituants pariétaux

D'autres constituants d'origines structurales ou non peuvent être présents dans les parois végétales de la plante :

Les pectines sont des polymères acides ou neutres composés d'acides galacturonique, de rhamnose, d'arabinose et de galactose. Ces polymères sont constitués d'une chaîne principale linéaire d'acides galacturoniques nommé polygalacturonane sur laquelle sont branchées des

chaînes secondaires plus ou moins ramifiées et formées de différents sucres neutres. Les pectines peuvent également piéger des ions de calcium pour former une structure particulièrement stable. Les pectines sont caractéristiques de la lamelle moyenne, des jonctions tricellulaires et des parois primaires des dycotylédones. Elles sont extractibles par l'eau, les agents chélateurs (tel que l'EDTA), l'oxalate d'ammonium et les acides dilués (Bag 2010 ; Bouloc 2006 ; Stevanovic et Perrin 2009).

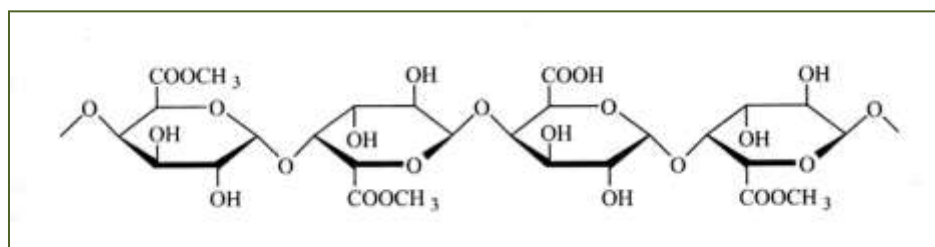


Figure I.21 : Structure du polygalacturonane, principal polysaccharide pectique

Les extractibles : les parois végétales contiennent des constituants en faible proportion comme les polyphénols, les oligosaccharides, les acides gras et les terpènes. Ces molécules sont solubles dans différents solvants de différente polarité (eau, éther, dichlorométhane, acétone, ...).

Les composés extractibles identifiés dans les fibres de chanvre sont des acides gras, des alcanes, des stérols libres et estérifiés, des cires.

Les extractibles de la chènevotte sont composés d'oligomères, d'hémicelluloses et de lignine ainsi que d'autres composés tels que les protéines, lipides, cires et cendres.

La graine du chanvre renferme quant à elle diverses quantités de polysaccharides, lipides, protéines, et vitamines (Bouloc 2006).

Des protéines structurales sont présentes dans la paroi végétale. Elles sont classées selon leur composition en acides aminés et leur schéma de glycosylation. Les extensines, protéines structurales majeures des parois des cellules primaires de la plupart des dicotylédones, sont des glycoprotéines riches en hydroxyproline glycosylée avec de l'arabinose, arabinobiose, arabinotriose et rabinotetraose et avec du glucose (Bag 2010).

Les minéraux comme la silice et les métaux lourds sont assimilés du sol lors de la croissance de la plante (Bouloc 2006).

D'autres minéraux bien que minoritaires jouent un rôle essentiel lors de la croissance de la plante : le potassium est un ion principal des cellules cytoplasmiques et possède un rôle fondamental dans le processus d'échanges transmembranaires. Mn, Fe, Cu, Zn font partie des constituants de nombreuses enzymes (Bag 2010).

Les minéraux interviennent dans différents mécanismes biologiques telles que la respiration, la photosynthèse ou la synthèse des protéines.

Des traces de cannabinoïdes, de terpènes, de flavonoïdes et d'alcaloïdes peuvent être décelés dans les différentes parties de la plante du chanvre.

Parmi les constituants bioactifs cités dans ce chapitre, on va s'intéresser plus particulièrement aux acides hydroxycinnamiques (les acides férulique et *p*-coumarique) et à leurs moyens d'extraction à partir des deux coproduits du chanvre qui sont la chènevotte et la poudre organo-minérale issues du procédé industriel de défibrage.

I. 2. Extraction des acides férulique et coumarique

Les acides féruliques et coumariques ainsi que tout autre composé phénolique présent dans la structure lignocellulosique de la plante peuvent être utilisés dans divers domaines industriels. Par contre, l'extraction de ces composés dépend très largement de leur solubilité et de leur mode de liaison avec les tissus végétaux donc de leurs caractéristiques structurales. Les méthodes d'extraction ainsi que celles de dosage des composés phénoliques ont connu jusqu'à ce jour un grand progrès, grâce à l'introduction de nouvelles technologies modernes et performantes.

I.2.1. Principes généraux de l'extraction de la matière végétale

De manière générale, les composés phénoliques sont extraits de la matière végétale par extraction liquide/solide. Celle-ci peut être divisée en trois parties :

- **Préparation de la matière végétale** : elle comprend le broyage de la matière végétale afin de faciliter l'accessibilité du solvant et d'augmenter sa capacité à extraire les molécules visées, et l'ajustement de son taux d'humidité.
- **Extraction liquide/solide** : elle permet la mise en contact des deux phases : solide (la matière végétale) et liquide (le solvant) afin de solubiliser le soluté et le diffuser à l'extérieur du solide. La diffusion étant le phénomène de déplacement des constituants de la matrice végétale vers le solvant, qui se traduit par leur migration irréversible, des zones de forte concentration vers celles de faible concentration.

L'extraction liquide/solide peut être présentée par trois étapes : la diffusion du solvant dans le solide, les échanges à l'interface liquide/solide et la diffusion des solutés dans leur solvant à travers le solide (Figure I.22). Cette partie peut être influencée par plusieurs facteurs et paramètres (Tableau I.8) (Evon 2008 ; Celhay 2013).

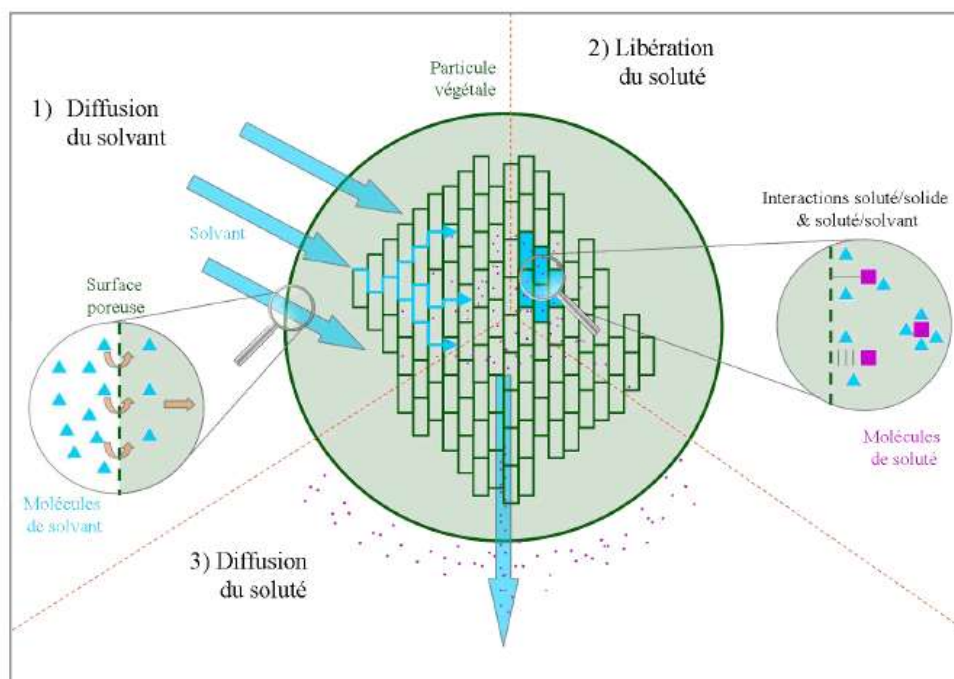


Figure I.22 : Représentation des étapes de l'extraction liquide/solide à partir d'une matrice végétale (Celhay 2013)

Tableau I.8 : Présentation détaillée des phénomènes impliqués dans l'extraction liquide/solide (Celhay 2013)

Processus élémentaire	Phénomènes	Facteurs impliqués
Diffusion du solvant	Transport du solvant dans le solide	Affinité solvant/soluté, viscosité, rapport de taille molécules/pores
Libération du soluté	Rupture des liaisons chimiques, diffusion au travers d'une membrane, dissolution	Nature des liaisons soluté/solide (hydrogène, covalente, etc), affinité soluté/solvant
Diffusion du soluté	Transport du soluté solvaté dans le solide, transfert du soluté en périphérie du solide vers le solvant	Porosité de la matrice, intégrité des membranes, viscosité
Processus élémentaire	Paramètres influençant ces facteurs	Effet
Diffusion du solvant	Choix du solvant, broyage, compression-détente, percolation forcée	Gonflement, remplissage, plastification
Libération du soluté	Choix du solvant, augmentation de la température, modification du pH	Molécules libres dans la matière
Diffusion du soluté	Réduction de taille des particules, déstructuration du solide, dilution, agitation, compression-détente, percolation forcée	Epuisement de la matière

- **Séparation liquide/solide** : elle est effectuée par différentes techniques telles que la filtration, la centrifugation, le pressage, l'essorage. Le choix de la technique dépend du degré d'affinité des deux phases solide et liquide. La séparation de ces deux phases permet la récupération de l'extrait c'est-à-dire le solvant contenant le soluté visé d'une part et du solide extrait d'autre part.

D'autres étapes peuvent s'ajouter au processus d'extraction liquide/solide et cela en fonction de l'usage ultérieur des composés extraits. Parmi ces étapes on peut citer la purification de l'extrait, peut-être du solide aussi et le séchage des résidus solides. Les principes généraux de l'extraction dépendent de la matrice à extraire.

A rappeler que les acides férulique et coumarique ainsi que les autres composés phénoliques visés se trouvent soit rattachés à d'autres composants de la matière végétale en formant des complexes glycosidiques LCC, soit à l'état libre dans les parois cellulaires végétales.

Les protocoles à utiliser sont dépendants de la nature de la liaison chimique entre le composé phénolique cible et la paroi cellulaire.

La nature de la matière première, les conditions opératoires telles que la température, la pression, le solvant et la technique utilisée jouent un rôle essentiel sur le rendement d'extraction.

I.2.2. Méthodes d'extraction des acides férulique et coumarique

Il n'existe pas de protocole universel pour l'extraction des acides férulique et *p*-coumarique. Il dépend de la matrice végétale (fruits, graines, feuilles ou tige) et de la complexité de sa composition, ainsi que de la sensibilité des acides phénoliques à l'hydrolyse et à l'oxydation (Xu *et al.* 2005 ; Stalikas 2007). Les techniques citées dans la littérature ont été groupées dans le Tableau I.9. Ce dernier nous permet d'avoir une idée globale des méthodes d'extraction actuellement appliquées pour l'extraction de ces composés bioactifs à partir de la matière lignocellulosique.

Tableau I.9 : Extraction d'acides phénoliques issus de la matière végétale et de la transformation des résidus lignocellulosiques

Matière végétale	Méthode d'extraction	Réactifs et conditions expérimentales appliquées	Composés identifiés (rendements/ matière sèche)	Références
Son de riz	Extraction par immersion dans un solvant	Eau, ratio L/S = 10 :1 vol/masse, 70 °C, 2 h	AF (11,04 µg/g) ApC (3,05 µg/g)	(Wanyo, Meeso, et Siriamornpun 2014)
		Prétraitement à l'air chaud : 120 °C, 30 min Traitement : Eau, ratio L/S = 10 :1 vol/masse, 70 °C, 2 h	AF (12,63 µg/g) ApC (3,12 µg/g)	
		Prétraitement par irradiation FIR : intensité 2 kW/m ² , 40 °C, 2 h Traitement : Eau, ratio L/S = 10 :1 vol/masse, 70 °C, 2 h	AF (14,84 µg/g) ApC (3,13 µg/g)	
		Prétraitement : hydrolyse enzymatique : cellulase, pH5, 50 °C, 24 h Traitement : Eau, ratio L/S = 10 :1 vol/masse, 70 °C, 2 h	AF (8,31 µg/g) ApC (3,06 µg/g)	
	Hydrolyse alcaline	NaOH (2 M), hydrogénosulfite de sodium (0,001 g), ratio S/L = 30 :1 g/mL, 20 °C, 24 h, agitation	AF (9 700 µg/g)	(Tilay <i>et al.</i> 2008)
		NaOH (1 M), ratio S/L = 5 :1 mg/mL, 100 °C, 2 h, à l'abri de la lumière	Acide protocatéchique (100 µg/g) acide vanillique (275 µg/g) AF (2 143 µg/g) ApC (7 788 µg/g)	(Wang et 2013)
Coques de riz	Extraction par immersion dans un solvant	Eau, ratio L/S = 10 :1 vol/masse, 70 °C, 2 h	AF (9,92 µg/g) ApC (1,52 µg/g)	(Wanyo, Meeso, et Siriamornpun 2014)
		Prétraitement à l'air chaud : 120 °C, 30 min Traitement : Eau, ratio L/S = 10 :1 vol/masse, 70 °C, 2 h	AF (11,49 µg/g) ApC (1,53 µg/g)	

Matière végétale	Méthode d'extraction	Réactifs et conditions expérimentales appliquées	Composés identifiés (rendements/ matière sèche)	Références
Coques de riz	Extraction par immersion dans un solvant	Prétraitement par irradiation FIR : intensité 2 kW/m ² , 40 °C, 2 h Traitement : Eau, ratio L/S = 10 :1 vol/masse, 70 °C, 2 h	AF (15,18 µg/g) ApC (1,55 µg/g)	(Wanyo, Meeso, et Siriamornpun 2014)
		Prétraitement : hydrolyse enzymatique : cellulase, pH5, 50 °C, 24 h Traitement : Eau, ratio L/S = 10 :1 vol/masse, 70 °C, 2 h	AF (6,54 µg/g) ApC (1,52 µg/g)	
Coques de riz broyées	Extraction par immersion dans un solvant	Eau, ratio L/S = 10 :1 vol/masse, 70 °C, 2 h	AF (13,72 µg/g) ApC (3,13 µg/g)	(Wanyo, Meeso, et Siriamornpun 2014)
		Prétraitement à l'air chaud : 120 °C, 30 min Traitement : Eau, ratio L/S = 10 :1 vol /masse, 70 °C, 2 h	AF (15,29 µg/g) ApC (3,13 µg/g)	
		Prétraitement par irradiation FIR : intensité 2 kW/m ² , 40 °C, 2 h Traitement : Eau, ratio L/S = 10 :1 vol/masse, 70 °C, 2 h	AF (25,64 µg/g) ApC (3,22 µg/g)	
		Prétraitement : hydrolyse enzymatique : cellulase, pH5, 50 °C, 24 h Traitement : Eau, ratio L/S = 10 :1 vol/masse, 70 °C, 2 h	AF (8,18 µg/g) ApC (3,15 µg/g)	
Paille de riz	Hydrolyse alcaline	NaOH (1 M), ratio S/L = 5 :1 mg/mL, 100 °C, 2 h, à l'abri de la lumière	Acide protocatéchique (84 µg/g) Acide vanillique (124 µg/g) AF (6058 µg/g) ApC (7 256 µg/g)	(Wang <i>et al.</i> 2013)

Matière végétale	Méthode d'extraction	Réactifs et conditions expérimentales appliquées	Composés identifiés (rendements/ matière sèche)	Références
Fibres de maïs	Extraction par ultrason	Méthanol, ratio L/S = 10 : 1 mL/g, centrifugation, sonication pendant 2 min	AF (940 µg/g) ApC (660 µg/g)	(Bauer, Harbaum-Piayda, et Schwarz 2012)
		Alcool isopropylique, ratio L/S = 10 : 1 mL/g , centrifugation, sonication pendant 2 min	AF (100 µg/g) ApC (100 µg/g)	
	Hydrolyse alcaline	NaOH (1, 2 et 4 M), sous atmosphère d'azote, ratio L/S = 30 :1 mL/g , 20 °C, 24,48 et 96 h	AF (12 400-14 000 µg/g) ApC (1 600-1 900 µg/g) Acide diférulique (600-1 600 µg/g)	
	Hydrolyse acide	Acide trifluoroacétique (50 mmol) ratio S/L = 25 : 1 g/mL, à ébullition, 3 h, sous agitation	AF estérifié à 1 et à 2 pentoses (67 090 µg/g)	(Bauer, Harbaum-Piayda, et Schwarz 2012)
Son de maïs	Hydrolyse alcaline	NaOH (2 M), hydrogénosulfite de sodium (0,001 g), ratio S/L = 30 :1 g/mL, 20 °C, 24 h, agitation	AF (14 900 µg/g)	(Tilay <i>et al.</i> 2008)
		NaOH (1 M), ratio S/L = 5 :1 mg/mL, 100 °C, 2 h, à l'abri de la lumière	Acide protocatéchique (61 µg/g) acide vanillique (71 µg/g) AF(22 395 µg/g) ApC(4 406 µg/g)	(Wang <i>et al.</i> 2013)
	Extraction assistée par micro-ondes	NaOH 2 M, ratio S/L = 40 : 1 mg/mL, 45secondes d'irradiation, 1400 W, 190 °C	AF (2193-4779 µg/g) ApC (171-547 µg/g) Acide diférulique (271-819 µg/g)	(Chiremba, Rooney, et Beta 2012)
Maïs (entrenoeuds)	Hydrolyse alcaline	NaOH (2M), ratio S/L = 10 : 1 mg/mL, température ambiante, 20 h, agitation	AF estérifié (6 000 µg/g) ApC estérifié (10 000-16 000 µg/g)	(Culhaoglu <i>et al.</i> 2011)
		NaOH (4 M), ratio S/L = 10 : 1 mg/mL, 170 °C, 2 h, agitation	AF total (8 000-11 000 µg/g) ApC total (10 000-18 000 µg/g) Selon le stade de développement de la plante	

Matière végétale	Méthode d'extraction	Réactifs et conditions expérimentales appliquées	Composés identifiés (rendements/ matière sèche)	Références
Tige de maïs	Hydrolyse alcaline	NaOH (1 M), ratio S/L = 5 : 1 mg/mL, 100 °C, 2 h, à l'abri de la lumière	Acide protocatéchuique (62 µg/g) acide vanillique (150 µg/g) AF(7530 µg/g) ApC(14718 µg/g)	(Wang <i>et al.</i> 2013)
Angélique (<i>Angelicae sinensis</i>)	Extraction par ultrason	Ethanol-eau 6:4, ratio S/L = 1 : 10 g/mL, , 30 min	AF (170-360 µg/g)	(Guo <i>et al.</i> 2003)
		Ethanol pur, ratio S/L = 1 : 8 g/mL, 25 °C, 30 min	AF (640 µg/g)	(Quan, Sun, et Qu 2009)
	Extraction par macération / percolation	Macération : éthanol/eau, 24 h, température ambiante Percolation : 15 gouttes /min, 8 h	AF (270 µg/g)	(Quan, Sun, et Qu 2009)
	Extraction assistée par micro-ondes	Ethanol 90 %, ratio L/S = 6 : 1 mL/g, 9 min d'irradiation, 850W	AF (1 750 µg/g)	(Liu <i>et al.</i> 2006)
	Extraction par fluide supercritique	CO ₂ pur, 60 min, 65 °C, 30 MPa	AF (100 µg/g)	(Quan, Sun, et Qu 2009)
		CO ₂ , co-solvant: éthanol, ratio éthanol/échantillon 1,61/1 (en masse), 5 h, 65 °C, 30 MPa	AF (640 µg/g)	
Chou (<i>Brassica oleracea</i>)	Extraction sous reflux	NaOH (1 %)-NaBH ₄ (0,5 %), reflux 10 min	AF (220 µg/g)	(Huang, Johanning, et O'Dell 1986)
Epinard (<i>Spinacea oleacera</i>)	Extraction sous reflux	NaOH (1 %)-NaBH ₄ (0,5 %), reflux 10 min	AF (1 130 µg/g)	(Huang, Johanning, et O'Dell 1986)
Caroube (<i>Ceratonia siliqua</i>)	Extraction sous reflux	Hexane, 3 h puis méthanol 5 h (Soxhlet)	AF (20 µg/g)	(Owen <i>et al.</i> 2003)
Son de blé	Hydrolyse alcaline	NaOH (1, 2 et 4 M), sous atmosphère d'azote, ratio S/L = 30 : 1 g/mL, 20 °C, 24,48 et 96 h	AF (2 700-3 800 µg/g) ApC (100-200 µg/g) Acide diférulique (70-300 µg/g)	(Bauer, Harbaum-Piayda, et Schwarz 2012)
		NaOH (2 M), hydrogénosulfite de sodium (0,001 g), ratio S/L = 30 : 1 g/mL, 20 °C, 24 h, agitation	AF (3 500 µg/g)	(Tilay <i>et al.</i> 2008)

Matière végétale	Méthode d'extraction	Réactifs et conditions expérimentales appliquées	Composés identifiés (rendements/ matière sèche)	Références
Son de blé	Hydrolyse alcaline	NaOH (1 M), ratio S/L = 5 : 1 mg/mL, 100 °C, 2 h, à l'abri de la lumière	Acide protocatéchique (37 µg/g) Acide vanillique (65 µg/g) AF(4 333 µg/g) ApC(1 002 µg/g)	(Wang <i>et al.</i> 2013)
	Hydrolyse alcaline assistée par ultrason	NaOH (2 %)/éthanol 2 : 1, hydrogénosulfite de sodium 6 %, ratio S/L = 12 :1 g/mL, 40 °C, pH 4, 30 min	AF (4 260 µg/g)	(Zhang <i>et al.</i> 2012)
Paille de blé	Hydrolyse alcaline	NaOH (2 M), hydrogénosulfite de sodium (0,001 g), ratio S/L = 30 :1 g/mL, 20 °C, 24 h, agitation	AF (8 700 µg/g)	(Tilay <i>et al.</i> 2008)
		NaOH (1 M), ratio S/L = 5 : 1 mg/mL, 100 °C, 2 h, à l'abri de la lumière	Acide protocatéchique (96 µg/g) Acide vanillique (156 µg/g) AF(3 257 µg/g) ApC(5 039 µg/g)	(Wang <i>et al.</i> 2013)
	Hydrolyse alcaline combinée avec une hydrolyse acide	NaOH(2 N), sous atmosphère d'azote, ratio S/L = 10 : 1 mg/mL, 20 °C, 24 h, agitation	AF estérifié (2 700 µg/g) ApC estérifié (3 400 µg/g)	(Pan, Bolton, et Leary 1998)
		Dioxane-HCl(2 N) 9 : 1(v/v), sous reflux, 1 h (2 ^{ème} étape réalisée sur le résidu issu de l'hydrolyse alcaline)	AF étherifié (2 100 µg/g) ApC étherifié (800 µg/g)	
Paille de lin	Hydrolyse alcaline	NaOH (4 M), 110 °C, 2 h	AF (100 µg/g) ApC (100 µg/g) Vanilline (400 µg/g) Acide vanillique (100 µg/g)	(Tapin <i>et al.</i> 2006)

Matière végétale	Méthode d'extraction	Réactifs et conditions expérimentales appliquées	Composés identifiés (rendements/ matière sèche)	Références
Ecorce d'ananas	Hydrolyse alcaline	NaOH (2 M), hydrogénosulfite de sodium (0,001 g), ratio S/L = 30 : 1 g/mL, 20 °C, 24 h, agitation	AF (200 µg/g)	(Tilay <i>et al.</i> 2008)
Ecorce d'orange			AF (200 µg/g)	
Ecorce de grenade			AF (1 900 µg/g)	
Bagasse de canne à sucre			AF (8 900 µg/g)	
Herbes (Bermudagrass et napiergrass)	Hydrolyse enzymatique	Prétraitement : acide férulique estérase, cellulase, solution tampon d'acétate de sodium (50 mM), 37 °C, pH = 5, 24 h (AF estérase) + 72 h (cellulase) Traitement par hydrolyse alcaline : NaOH (2 M), température ambiante, 24 h	AF (1 280 µg/g) ApC (1 050 µg/g)	(Anderson <i>et al.</i> 2005)

La plupart des composés phénoliques se trouvent dans les plantes liés de façon covalente à un polymère non hydrosoluble (Niwa et Miyachi 1986). Il est donc nécessaire de trouver une étape supplémentaire efficace qui améliore la libération de ces composés. Des étapes de prétraitement peuvent être envisagées telles que le traitement thermique, l'irradiation sous infrarouge lointain (FIR), et le traitement enzymatique (Wanyo, Meeso, et Siriamornpun 2014). Ces méthodes ont été aussi étudiées par d'autres groupes pour libérer et activer les composés de faible poids moléculaire dans différentes matières végétales comme l'orge (Duh *et al.* 2001), les coques de riz (Lee *et al.* 2003) et le son de riz (Wanyo, Meeso, et Siriamornpun 2014).

En se référant à la littérature, il est aussi possible de considérer les effets positifs de la réduction de la taille des particules. Ce traitement permet la rupture des structures vacuolaires et pariétales dans lesquelles sont accumulés les composés phénoliques. Le solvant aura ainsi accès à toute la matière solide ce qui facilitera la libération des composés phénoliques (Wanyo, Meeso, et Siriamornpun 2014).

On remarque aussi les effets positifs de la température, de l'ajout de réactifs, de la durée de l'extraction, et des spécificités de chaque méthode sur le rendement en composés phénoliques.

En se référant au Tableau I.9, les techniques d'extraction peuvent être groupées en trois catégories : les méthodes conventionnelles, les extractions sous pression et les technologies potentielles.

Parmi ces méthodes, on peut distinguer les conditions d'extraction dites « douces » (température ambiante ou ne dépassant pas les températures d'ébullition des solvants, pression atmosphérique, solvants verts, solvants alternatifs...) de celles dites « sévères » (température élevée, pression élevée, solvants organiques, force mécanique donc consommation d'énergie, ...).

Les méthodes largement appliquées pour l'extraction des composés phénoliques utilisent des solvants organiques comme l'éthanol, le méthanol, l'acétate d'éthyle, l'acétone, ou le dichlorométhane qui sont coûteux et néfastes pour l'environnement. Cependant, les règlements stricts pour la santé et l'augmentation de la sensibilisation de la population envers l'usage des solvants organiques dans les produits alimentaires et cosmétiques orientent la recherche vers des procédés respectueux de l'environnement.

Les **méthodes conventionnelles** fréquemment utilisées sont :

- **Extraction par solvant** : à reflux, par sonication (sous ultrasons), par simple immersion ou par percolation
 - *Sonication* : le terme ultrasons est utilisé pour décrire les sons allant de 16 kHz à 1 GHz, habituellement générés par un transducteur qui convertit l'énergie mécanique ou électrique en vibrations à haute fréquence. L'efficacité de cette technique dans l'extraction est due à ce qu'on appelle « pression acoustique » qui génère plusieurs phénomènes importants tel que la cavitation, le frottement en surface des molécules, et l'augmentation de la vitesse de diffusion. La cavitation est le phénomène le plus important ; en général elle peut être définie comme la production, la croissance ultérieure et l'effondrement des cavités libérant dans un petit endroit de grandes énergies résultant en des densités d'énergie très élevées. La cavitation se produit simultanément à des millions d'endroits dans le réacteur et génère des conditions de températures et pressions très élevées. La cavitation peut entraîner la génération de turbulence locale et la microcirculation du liquide améliorant le transport des molécules. Les ultrasons ont été appliqués pour l'extraction d'un certain nombre de matières végétales en réduisant considérablement le temps d'extraction et en augmentant le rendement maximal de l'extraction (Rostagno, Palma, et Barroso 2003 ; Albu *et al.* 2004 ; Lee et Lin 2007).
 - *Macération et percolation* : largement utilisées en pharmacologie, la percolation et la macération présentent plusieurs désavantages comme la longue durée de l'extraction et les réactions non souhaitables d'hydrolyse, d'oxydation, de dégradation ou de réarrangement (Sun *et al.* 2006).
- **L'hydrolyse** : la vitesse de réaction et la sélectivité de l'hydrolyse dépendent du catalyseur mais surtout des conditions opératoires. Elle peut être catalysée par des composés biochimiques (enzymes) ou par des composés chimiques comme les bases (NH₃, NaOH, etc...) ou les acides (HCl, H₂SO₄, HF, etc...) qui conduiront à toute une gamme de produits, allant du polymère au monomère, en passant par les oligomères.

Pour (Lu *et al.* 2005), l'hydrolyse est une étape nécessaire pour obtenir l'acide férulique à partir des férulates conjugués. Les auteurs ont groupé les acides féruliques en deux groupes : le premier comprend les acides féruliques libres, ce sont les acides féruliques librement disponibles dans les plantes et ils en sont caractéristiques. Le second comprend la totalité des acides féruliques c'est-à-dire la somme des acides libres et de ceux obtenus par hydrolyse.

- *Hydrolyse en milieu alcalin* : L'action des bases a pour but d'hydrolyser les liaisons esters entre polysaccharides et acides hydroxycinnamiques principalement les acides *p*-coumarique et férulique (hydrolyse des liaisons esters entre unités S (sinapyle) et acide *p*-coumarique, et entre hémicelluloses et acide férulique), les liaisons hydrogènes entre les microfibrilles d'hémicelluloses et de cellulose, mais aussi de rompre les liaisons éthers entre les acides phénoliques et la lignine dans une étape d'hydrolyse supplémentaire et dans des conditions plus sévères. L'hydrolyse basique peut être aussi considérée comme un prétraitement des matières lignocellulosiques. Son but est de favoriser l'accessibilité des différents composés de la matière végétale. Par exemple, la fraction des lignines de plantes à fibres longues (alcalines) de graminées extractibles par un solvant organique représente 0,3 % à 0,8 % de la masse des échantillons de blé et de bagasse et est principalement constituée d'acides hydroxycinnamiques (acides férulique et *p*-coumarique) (Lepifre *et al.* 2004).

Dans la plupart des cas, l'hydrolyse alcaline est effectuée sous une atmosphère inerte (Ar, N₂) pour éviter l'oxydation des composés phénoliques et en absence de lumière pour empêcher l'isomérisation.

Une étape de purification par extraction liquide-liquide peut être appliquée afin d'extraire les composés phénoliques (Sanchez 1990 ; Barberousse *et al.* 2008).

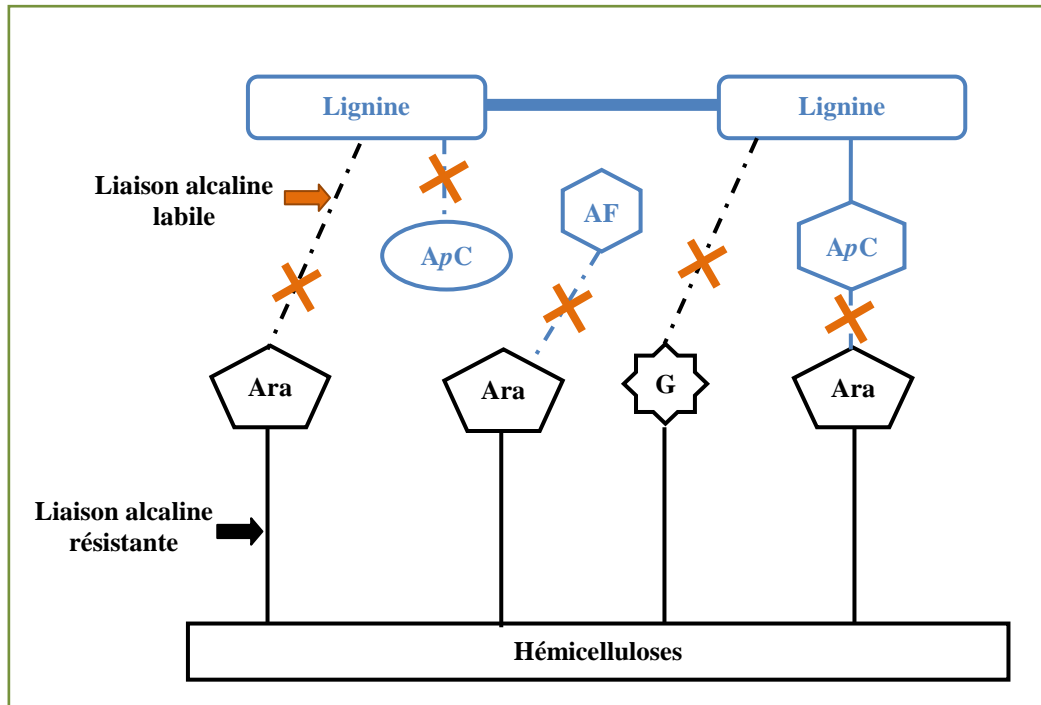


Figure I.23 : Schéma représentant les coupures de liaison dans le complexe lignine/phenols-polysaccharides en condition alcaline. Ara : arabinose ; AF : acide férulique ; ApC : acide p-coumarique ; G : acide D-glucuronique (Zheng 2011)

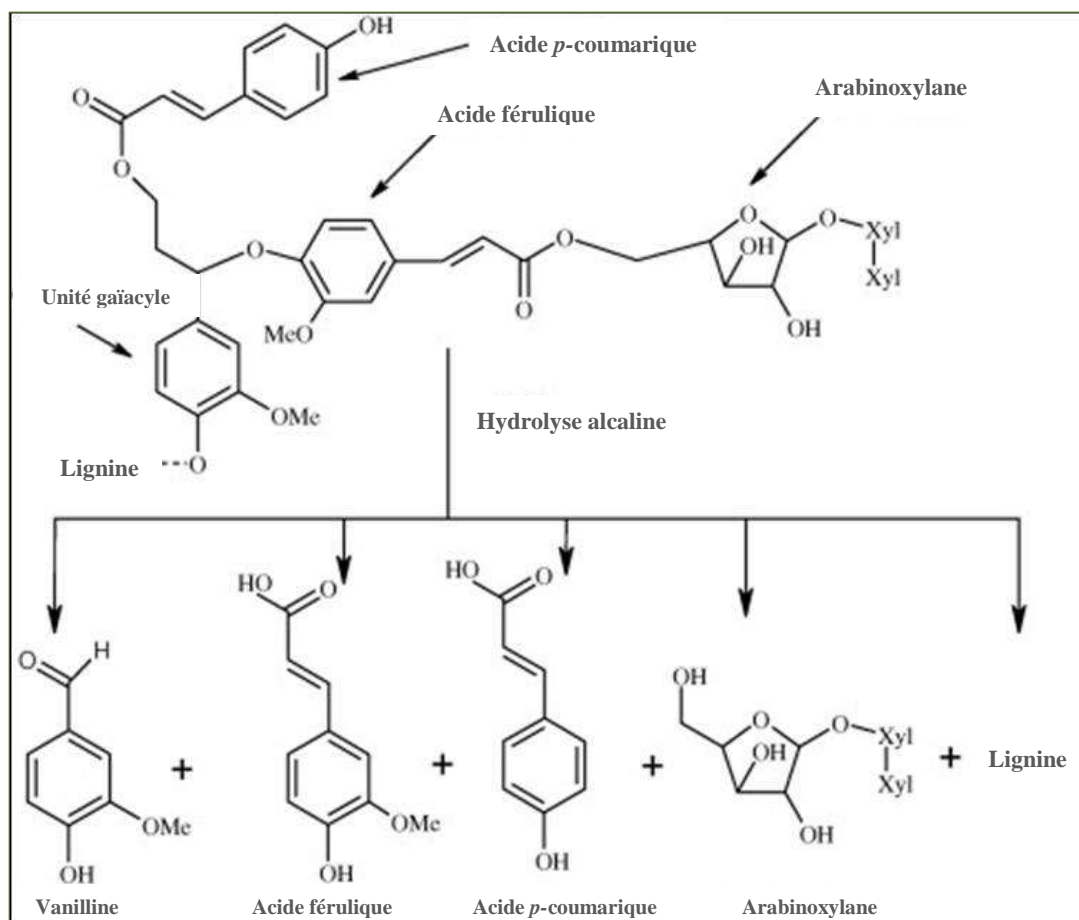


Figure I.24 : Schéma représentant le clivage des complexes lignine/phenols-polysaccharides en condition alcaline (Buranov et Mazza 2009)

- *Hydrolyse en milieu acide* : un acide inorganique tel que l'acide sulfurique ou chlorhydrique permet la solubilisation des sucres et donc la rupture des liaisons entre les monomères des hémicelluloses. Cependant, le traitement de la matière végétale seulement par hydrolyse acide solubilise les sucres alors que les liaisons éthers et esters restent intactes. L'efficacité de l'hydrolyse acide apparaît quand elle arrive en deuxième étape après une hydrolyse alcaline dans le but de rompre les liaisons éthers (Pan, Bolton, et Leary 1998 ; Barberousse *et al.* 2008).
- *Hydrolyse enzymatique ou catalysée par des composés biochimiques* : les acides p-coumariques et les acides féruliques liés par des liaisons esters peuvent être libérés par traitement avec l'enzyme feruloyl estérase. Plusieurs autres enzymes figurent dans la littérature comme la cellulase, la xylanase, la pectinase, la

polygalacturonase. Elles sont utilisées en étape de prétraitement ou de traitement de la matière végétale. Cependant cette technique est limitée par les faibles rendements, la longue durée de l'étape d'extraction, la nécessité d'enzymes spécifiques, sans oublier leurs prix élevés et les conditions de croissance de ces enzymes (Kim et Mazza 2006 ; Barberousse et. 2008 ; Buranov et Mazza 2008).

L'extraction par fluides pressurisés regroupe des méthodes simples, très efficaces et qui consomment beaucoup moins de solvants que les méthodes conventionnelles.

L'extraction sous pression comprend plusieurs techniques dont :

- **Extraction par eau subcritique :** Respectueuse de l'environnement, l'extraction par eau à l'état subcritique offre l'opportunité de développer des bioproduits. L'eau est à l'état subcritique, c'est à dire maintenue liquide au-delà de son point d'ébullition, lorsque la température se situe au-dessus de sa température d'ébullition et en dessous de son point critique situé à 374 °C et 221 bar (Luque De Castro, Jimenez-Carmona, et Fernandez-Perez 1999 ; King et Grabiel 2007). Dans les conditions en milieu subcritique, les propriétés de l'eau sont modifiées (constante diélectrique, viscosité et tension de surface), il est alors possible d'obtenir une gamme de polarité de l'eau en faisant varier la température. L'extraction des composés apolaires ou de faible polarité se produit à de plus hautes températures que les composés polaires. Les autres avantages sont : l'augmentation de la sélectivité de l'extraction limitée cependant par l'effet de la température sur certaines substances à extraire, la rapidité et la meilleure efficacité (Kim et Mazza 2006).
- **Extraction par fluide supercritique :** le CO₂ est le fluide le plus utilisé. Il est inerte chimiquement et de faible toxicité. Pour les composés polaires comme l'acide férulique, très peu solubles dans le dioxyde de carbone supercritique, l'ajout d'un co-solvant polaire augmente l'efficacité de leur extraction (Sun *et al.* 2006).

Selon le Tableau I.9, les teneurs en acides phénoliques sont variables et dépendent de la matière végétale extraite, du solvant d'extraction, de la température à laquelle l'extraction a été réalisée

et de la méthode utilisée. Des méthodes d'extraction qui consomment moins de temps et de solvants donc moins coûteuses et permettant d'augmenter les rendements d'extraction, ou d'autres permettant de combiner plusieurs traitements et phénomènes lors d'un seul processus, peuvent être une solution potentielle pour l'extraction des composés phénoliques. L'extraction assistée par micro-ondes et l'extrusion bi-vis en sont deux exemples.

I.2.3. Technologies potentielles applicables à l'extraction des acides férulique et coumarique

I.2.3.1. Micro-ondes

La particularité de l'extraction assistée par micro-ondes (MAE), est que les micro-ondes atteignent directement l'intérieur du végétal. Le chauffage par les micro-ondes résulte par la suite de la transformation en chaleur de l'énergie d'une onde électromagnétique. Cette transformation se produit par deux mécanismes : la conduction ionique et la rotation dipolaire à la fois dans le solvant et l'échantillon. La conduction ionique est due à la migration électrophorétique des ions lorsqu'un champ magnétique est appliqué. La résistance de la solution à ce flux d'ions et la collision des molécules entre elles chaque fois que la direction des ions change suite au changement de polarité du champ appliqué, génèrent leur friction et donc le chauffage de la solution.

La rotation dipolaire est liée au mouvement des molécules polaires qui possèdent des moments dipolaires et qui tentent de s'aligner avec le champ électrique. Quand le champ électrique diminue, le désordre thermique est rétabli ce qui se traduit par la libération d'énergie thermique.

La sélectivité est la première particularité du chauffage par micro-ondes, parce que seules les molécules polaires peuvent être « chauffées ». Le transfert de chaleur est la deuxième particularité. Celui-ci s'effectue de l'intérieur du mélange réactionnel vers l'extérieur et donc différemment du chauffage conventionnel (par convection). Le chauffage par micro-ondes est volumétrique ce qui veut dire que tout l'échantillon est chauffé au même moment (Figure I.25) (Rostagno et Prado 2013).

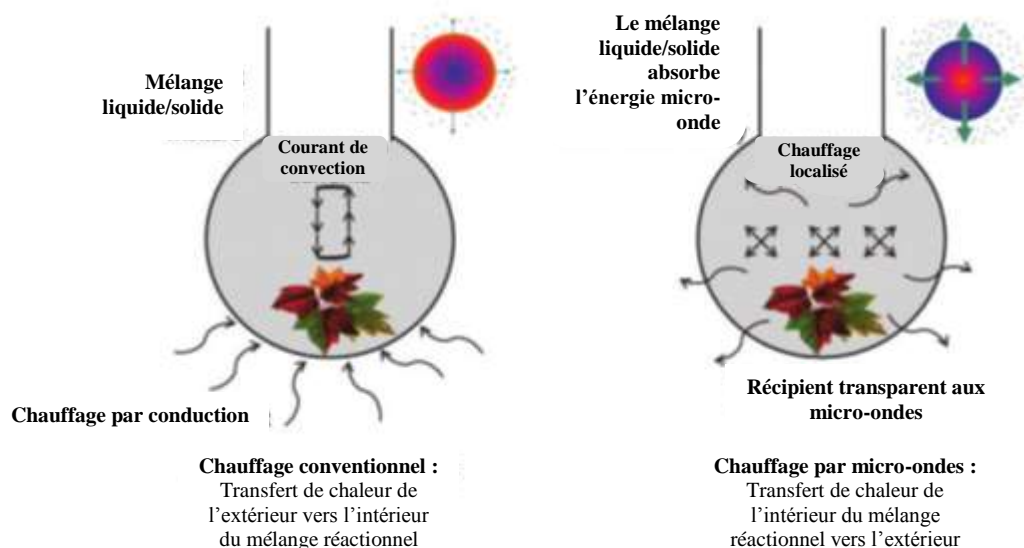


Figure 1.25 : Les deux modes de chauffages : conventionnel et volumétrique (Rostagno et Prado 2013)

Le chauffage par micro-ondes peut contribuer à la fragilisation voire la rupture des parois cellulaires. La montée brutale de la température à l'intérieur des cellules génère une augmentation de la pression interne, ce qui provoque leur éclatement. Il contribue aussi à une meilleure diffusion du solvant dans la matière végétale suite à la migration des ions dissous en solution, et à la solvation des composés cibles.

Lors du choix des paramètres pour l'extraction assistée par micro-ondes, il faut tenir compte des paramètres physiques dont la solubilité, la constante diélectrique, et le facteur de dissipation. Tout d'abord il faut choisir un solvant dans lequel le soluté cible est soluble. La polarité du solvant est aussi un facteur très important dans l'extraction assistée par micro-ondes parce que les solvants possédant des constantes diélectriques élevées (comme l'eau) peuvent absorber plus d'énergie des micro-ondes. Les solvants polaires sont considérés plus appropriés que les non-polaires (Wang et Weller 2006). Cependant, il existe un avis contraire, c'est la théorie de la rupture de la paroi cellulaire qui considère que les solvants transparents aux rayonnements micro-ondes sont plus adaptés que ceux qui absorbent le rayonnement. Dans ce cas, le produit solide absorbera toute l'énergie des micro-ondes si les caractéristiques diélectriques sont adéquates. Le solvant s'échauffera à son tour par transfert d'énergie du solide.

Concernant le facteur de dissipation, plus ce facteur est élevé, plus la chaleur sera distribuée à travers la matrice d'extraction et transférée plus rapidement au solvant (Escribano-Bailon et Santos-Buelga 2003).

Les premières études utilisant les micro-ondes étaient dans le domaine de la chimie tel que l'analyse chimique, la synthèse organique, les catalyses homogène et hétérogène. Cependant, cette technologie est de plus en plus employée dans le domaine de l'extraction des produits végétaux (Alfaro *et al.* 2003) comme l'extraction des huiles essentielles (Collin *et al.* 1993 ; Chen et Spiro 1995 ; de Vasconcelos Silva *et al.* 1999 ; Lucchesi, Chemat, et Smadja 2004 ; . Lucchesi 2005 ; Golmakani et Rezaei 2008 ; Thi, Anh, et Thach 2008 ; Berka-Zougali *et al.* 2012 ; Filly *et al.* 2014), des composés organiques volatiles (Stashenko, Jaramillo, et Martínez 2004a ; Stashenko, Jaramillo, et Martínez 2004b), de la lignine (Monteil-Rivera *et al.* 2012), des composés phénoliques (Pan, Niu, et Liu 2003 ; Proestos et Komaitis 2008 ; Tsubaki, Sakamoto, et Azuma 2010 ; Chiremba, Rooney, et Beta 2012 ; Baiano *et al.* 2014 ; Dahmoune, Spigno, *et al.* 2014 ; Dahmoune, Nayak, *et al.* 2014 ; Milutinović *et al.* 2014 ; Dahmoune *et al.* 2015) et des sucres (Tsubaki, Ozaki, et Azuma 2010 ; Yemiş et Mazza 2011).

L'extraction assistée par micro-ondes est une alternative intéressante en comparaison avec les méthodes classiques puisqu'elle permet la réduction de la quantité de solvant utilisé (ou ne nécessitant pas l'utilisation de solvants comme dans le cas des réactions auto-hydrolytiques (Périno-Issartier, Abert-Vian, et Chemat 2011 ; Li *et al.* 2013)), ainsi que la réduction de la durée du traitement (en raison de l'échauffement direct et interne rapide produit par le couplage direct de l'énergie du rayonnement micro-onde avec les molécules présentes dans le mélange réactionnel). L'utilisation de l'énergie des micro-ondes présente aussi d'autres avantages comme : des rendements plus élevés, un chauffage plus sélectif, un transfert d'énergie plus rapide, une réponse plus rapide au contrôle de la température, un démarrage plus rapide, et une technique moins coûteuse (Lucchesi 2005 ; Beejmohun *et al.* 2007 ; Chemat *et al.* 2015).

I.2.3.2. Extrusion Bi-vis

Cette technologie permet d'effectuer plusieurs opérations (mélange, extrusion, fractionnement) et de transformer le matériau utilisé physiquement et chimiquement en une seule étape. L'appareil fonctionne en continu le long de deux vis co-pénétrantes et co-rotatives et avec un profil modulable selon les objectifs visés.

Son principe repose sur la combinaison d'actions mécaniques (cisaillement, compression et détente), thermiques (choix de la température du fourreau) et chimiques (la nature du solvant utilisé et le point ainsi que le nombre d'injections) d'où son appellation réacteur Thermo-Mécano-Chimique (TMC).

Le fonctionnement d'un extrudeur bi-vis est basé sur : une action de transport effectuée par des vis de convoyage, des actions de compression radiales et de cisaillement effectuées par des vis monolobes et qui sont plus significatives par l'usage de vis bilobes, et des actions de cisaillement intense, de mélange et de forte compression axiale effectuées par des contrefilets ou vis à pas inverse.

La performance de l'extrudeur est principalement influencée par la configuration du profil de vis, donc par le choix des éléments de vis (longueur et pas de vis) et de leurs positions (angle entre deux vis). Plusieurs autres paramètres peuvent être ajustés : la température, les débits solides et liquides, la vitesse de rotation, le ratio liquide/solide et le temps de résidence de la matière dans l'extrudeur (N'Diaye *et al.* 1996).

L'extrusion bi-vis peut être utilisée en étape de prétraitement pour l'imprégnation, la solubilisation, ou la cuisson du matériau (Vandenbossche, Doumeng, et Rigal 2014). Mais aussi pour le fractionnement et l'extraction liquide/solide :

- L'industrie agroalimentaire utilise abondamment l'extrusion pour la cuisson-extrusion des produits amylacés (produits céréaliers, biscuits, biscottes, snacks, crackers...), la texturation des protéines et la fabrication d'aliments pour les animaux d'élevage comme les poissons et les animaux de compagnie (Evon 2008).
- Dans le domaine des matières plastiques, cette technologie est utilisée pour le mélange en milieu fondu et l'extrusion des composants de ces matières.

- L'extrusion bi-vis est aussi utilisée pour le défibrage de matières lignocellulosiques en vue de la production de pâte à papier (Manolas *et al.* 1995 ; de Choudens et Perrin 1996 ; Maréchal 1998 ; Marechal et Rigal 1999), de panneaux de fibres (Markessini *et al.* 1997) et pour l'obtention d'agromatériaux composites à matrice protéique ou polysaccharidique (Juliette Leyris 1998 ; Leyris *et al.* 1998 ; Peyrat 2000 ; Rouilly 2002 ; Jorda 2003 ; Geneau-Sbartai 2006 ; Chabrat 2012).

S'ajoute à tous ces usages le fractionnement de la matière végétale pour l'extraction de fractions moléculaires ciblées. Depuis une vingtaine d'années, l'élargissement des domaines d'applications du réacteur TMC au fractionnement de la matière végétale a permis le développement de véritables réacteurs capables de transformer ou de fractionner physiquement et chimiquement la matière végétale en une seule étape. Ainsi et dans le but de la valorisation des agroressources, l'extrusion bi-vis a été utilisée pour :

- l'extraction de l'huile à partir des graines de colza (Guyomard 1994 ; Bouvier et Guyomard 1997), des graines de neem (Faye 2010), des graines de tournesol (Isobe *et al.* 1992 ; Guyomard 1994 ; Lacaze-Dufaure 1998 ; Dufaure *et al.* 1999 ; Dufaure, Mouloungui, et Rigal 1999 ; Kartika *et al.* 2004 ; Kartika, Pontalier, et Rigal 2005 ; Kartika, Pontalier, et Rigal 2006 ; Evon *et al.* 2007, 2009), et de la plante entière de tournesol (Evon 2008) ;
- pour l'estérification des triglycérides à partir des graines de tournesol (Lacaze-Dufaure 1998),
- pour l'extraction de polysaccharides à partir de la paille et du son de blé (Marechal 2001) et des hémicelluloses et de la lignine à partir de la paille de blé (Magro 1995) ;
- pour l'extraction d'hémicelluloses à partir de la paille et du son de blé (Zeitoun 2011), du sorgho (Manolas 1993), du bois de peuplier et de sorgho (N'Diaye 1996) et du bois de peuplier (Prat 1998 ; N'Diaye et Rigal 2000) ;
- pour l'extraction des pectines à partir de la pulpe de betterave (Jorda 2003) et de la tige et du capitule de tournesol (Maréchal 1998 ; Marechal et Rigal 1999) ;
- pour l'estérification des pectines à partir de la tige et du capitule de tournesol (Maréchal 1998) ;

- pour l'extraction des protéines à partir des graines de tournesol (Silvestre et al. 1999), de la plante entière de tournesol (Evon *et al.* 2007 ; Evon 2008) et de la luzerne (Colas 2012) ;
- et pour l'extraction des polyphénols à partir des coproduits du pin maritime et du peuplier (Celhay 2013).

Comparativement aux méthodes conventionnelles, l'extrudeur bi-vis est utilisé pour sa capacité à enchaîner, en continu et dans le même appareillage, trois opérations élémentaires indispensables à tout schéma de fractionnement de la matière végétale : le broyage de la matière, l'extraction et la séparation liquide/solide (Evon *et al.* 2010). Il permet de travailler dans des conditions opératoires modulables telles que la durée de l'extraction, la température et l'intensité du cisaillement (N'Diaye *et al.* 1996), et d'éviter les étapes de prétraitement de la matière végétale (Savoire, Lanoisellé, et Vorobiev 2013). L'avantage majeur de l'extrusion bi-vis est que l'extraction et la séparation liquide/solide peuvent être menées simultanément d'une manière très efficace (N'Diaye *et al.* 1996).

Dans notre étude l'extraction assistée par micro-ondes et l'extrusion bi-vis sont considérées comme des techniques alternatives à l'extraction liquide/solide classique pour l'isolement de métabolites secondaires, tels que les composés phénoliques à partir des coproduits du chanvre. L'extraction assistée par micro-ondes permet la réduction du temps d'extraction, la réduction des quantités de solvants et un meilleur rendement. L'extrusion bi-vis quant à elle est une technique qui permet de regrouper en continu les étapes de l'extraction liquide/solide. Elle permet la diffusion du solvant dans la matière végétale, la libération du soluté de son compartiment cellulaire et la diffusion de ce soluté à travers la matière végétale. Sans oublier le broyage de la matière végétale, le mélange et la séparation des deux phases solide et liquide.

I. 3. Analyse des acides férulique et coumarique

Les méthodes de détection des composés phénoliques et donc des acides féruliques et coumariques, ont été largement discutées dans la littérature et ont fait l'objet de plusieurs revues bibliographiques dont celles de (Stalikas 2007 ; Barberousse *et al.* 2008 ; Motilva, Serra, et Macià 2013 ; Capriotti *et al.* 2015). L'identification et la quantification de ces molécules peuvent être réalisées par différentes méthodes.

Au cours des vingt dernières années, l'HPLC a été la technique séparative la plus utilisée pour l'étude des composés phénoliques (Tableau I.10). Les analyses mettent en œuvre une chromatographie en phase inverse avec une phase stationnaire C₁₈ (apolaire). Les colonnes ont généralement des longueurs, des diamètres internes et des tailles de particules variant respectivement de 10 à 25 cm, 3,9 à 4,6 mm et 3 à 10 µm. Afin d'améliorer les séparations chromatographiques et de réduire les temps d'analyse, des colonnes de dimensions plus petites ont été mises sur le marché, elles permettent de travailler en uHPLC ou uPLC.

Les phases mobiles sont utilisées en mode isocratique ou en gradient d'élution selon la nature des matrices étudiées. Il s'agit généralement de mélanges eau/méthanol ou eau/acétonitrile lesquels sont acidifiés : acide acétique, formique voire phosphorique ou perchlorique. Il est en effet, important d'éviter l'ionisation des analytes afin d'avoir une résolution et une reproductibilité des analyses satisfaisantes.

Les acides phénoliques sont étudiés par détection dans le domaine ultraviolet/visible (UV/VIS), généralement au moyen de détecteurs à barrette de diodes (DAD), à barrette de photodiodes (PDA) ou UV-fluorescence. Les acides phénoliques présentent une absorption maximale dans le domaine de l'UV et leur longueur d'onde caractéristique dépend de la nature du solvant et du pH de la solution (Naczek et Shahidi 2004). L'acide férulique présente, en solution aqueuse (à pH 7), deux maxima d'absorption : 290 et 310 nm. La longueur d'onde caractéristique à pH 10 du férulate de sodium est de 345 nm. Lié par des liaisons esters aux polysaccharides, le groupe féruloyl-arabinoxylan formé absorbe à 300 et 325 nm à pH 7 et à 370 nm à pH 10 (Synytsya *et al.* 2003a). En revanche, l'acide *p*-coumarique lié aux polysaccharides, le *p*-coumaroyl-arabinoxylan, présente un épaulement à 290 nm et un maximum d'absorption à environ 320 nm (Akin 1995). Les acides hydroxycinnamiques sont détectés à 320 nm, les acides benzoïques à 280 nm et les flavonols à 370 nm.

L'HPLC peut également être couplée à une détection électrochimique/ampérométrique, RMN ou spectrométrie de masse (Motilva, Serra, et Macià 2013 ; Capriotti *et al.* 2015). Cette dernière est la principale méthode utilisée pour identifier les analytes alors que la détection UV est mise en œuvre pour la quantification.

La microspectrophotométrie UV largement utilisée pour étudier, dans une matrice végétale, la distribution de la lignine dans les différentes couches de la paroi cellulaire (Karami *et al.* 2014), a été aussi utilisée pour la localisation et l'analyse des composés phénoliques examinés, dans la plupart des cas, à 278 nm (Morrison *et al.* 1993 ; Akin 1995 ; Koch et Kleist 2001 ; Koch 2004 ; Koch et Grünwald 2004).

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est peu utilisée pour l'étude de ces molécules en raison de leur faible volatilité. Une réaction de dérivation (triméthylsilylation ou silylation avec la N,N-bis(triméthyl-silyl)trifluoroacétamide (BSTFA)) (Barberousse *et al.* 2008) est nécessaire pour adapter l'analyse à cette technique. Les acides férulique et coumarique peuvent aussi être étudiés en CPG par couplage avec la pyrolyse (Tableau I.10).

La chromatographie électrocinétique micellaire capillaire (Guo *et al.* 2003) et des techniques électrophorétiques telles que l'électrophorèse capillaire de zone, l'isotachophorèse (Barberousse *et al.* 2008) sont également utilisées, mais de manière marginale.

Une étape de prétraitement ou de purification des échantillons est très souvent indispensable pour l'étude des acides phénoliques à partir des méthodes citées précédemment. Parmi les techniques les plus utilisées, on peut citer l'extraction liquide-liquide à l'éther diéthylique (Krygier, Sosulski, et Hogge 1982), à l'acétate d'éthyle (Méchin *et al.* 2000) et au chloroforme (Xu *et al.* 2005) ; l'extraction en phase solide (*Solid-phase extraction*, ou SPE) (Tian *et al.* 2005 ; Pérez-Magariño, Ortega-Heras, et Cano-Mozo 2008) ; la microdispersion en phase solide (Capriotti *et al.* 2015) ou la précipitation sélective des molécules interférentes (Ky, Noirot, et Hamon 1997 ; Fujioka et Shibamoto 2006).

La chromatographie sur couche mince (CCM) et la chromatographie sur couche mince haute-performance (HPTLC) peuvent permettre de séparer les composés cibles du reste du mélange. Elles sont principalement utilisées pour la séparation préliminaire des différents constituants de l'extrait et leur purification (Mabinya, Mafunga, et Brand 2006 ; Tilay *et al.* 2008 ; Sajewicz *et al.* 2012 ; Bertrams *et al.* 2013).

D'autres auteurs (Culhaoglu *et al.* 2011 ; Fujioka et Shibamoto 2006) ont utilisé la méthode de « Carrez ». Cette méthode basée sur deux principales étapes de purification, consiste à précipiter les polysaccharides puis les protéines. Les acides hydroxycinnamiques restant en solution seront ensuite analysés.

La spectroscopie infrarouge (IR) présente une excellente alternative à l'analyse des acides phénoliques en solution, cette dernière est coûteuse et demande beaucoup de temps parce qu'elle nécessite l'extraction des composés ciblés et la destruction des échantillons. La spectroscopie IR présente l'avantage de l'analyse des composés insolubles dans la matrice sans nécessité de les extraire donc des composés phénoliques liés. La spectroscopie IR (proche et moyen) est une méthode analytique puissante, rapide, précise et non-destructive de l'échantillon (Zhang *et al.* 2008), utilisée pour déterminer la teneur en composés phénoliques dans plusieurs matrices végétales et produits alimentaires (Ram, Dowell, et Seitz 2003 ; Synytsya *et al.* 2003b ; Schulz et Baranska 2007). La spectroscopie IR à transformée de Fourier (*Fourier-transformed Infrared* ou FTIR) a été appliquée pour la détection des composés phénoliques directement dans le vin (Versari *et al.* 2010), et dans les plantes (Lamiaceae) (Saltas *et al.* 2013). La spectroscopie IR a été aussi utilisée comme méthode de détection des composés phénoliques dans divers types de solvants notamment dans des extraits méthanoliques d'oignons et d'échalotes (Lu *et al.* 2011)..

Tableau I.10 : Exemples de méthodes d'analyse des acides férulique et coumarique

HPLC					
Purification de l'extrait	Phase stationnaire	Phase mobile et méthode	Détection	Matrice	Référence
Extraction avec l'acétate d'éthyle, évaporation à sec du solvant, dissolution dans du méthanol	RP18 Nucleodur (250 mm x 4 mm, 5 µm)	A : 0,1% acide formique dans l'eau B : 100% acétonitrile Gradient : 0 min 0% B ; 7 min 10% B ; 20 min 19% B ; 25 min 22% B ; 26 min 23% B ; 35 min 24% B ; 50 min 50% B ; 64 min 100% B ; 67 min 0% B ; 70 min 0% B Débit : 0,7 mL/min Temp. de colonne : 20°C	DAD : 330 nm Spectromètre de masse (Trappe d'ions) équipé d'une ionisation d'électropulvérisation par électronébulisation (ESI) en mode négatif	Fibres de maïs Son de blé	(Bauer, Harbaum-Piayda, et Schwarz 2012)
	C-18 LUNA (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)	A : 3% acide acétique dans l'eau B : 3% acide acétique, 25% acétonitrile et 72% eau Gradient 0 - 40 min, de 100 à 30% A et 70% B ; 40-45 min, de 30 à 20% A et de 70 à 80% B ; 45-55 min, de 20 à 15% A et de 80 à 85% B ; 55-57 min, de 15 à 10% A et de 85 à 90% B ; 57-75 min 10% A et 90% B Débit : 0,8 mL/min Temp. de colonne : 40°C	DAD : 280 nm (acides hydroxybenzoïques) 320 nm (acides hydroxycinnamiques)	Son de riz Coques de riz	(Wanyo, Meeso, et Siriamornpun 2014)
	YWG C18 (250 mm x 4,6mm, 5µm)	Méthanol/ eau (1% acide acétique) 35:65, v/v Débit : 1 mL/min Temp. de colonne : 45°C	UV : 320 nm	Angélique	(Quan, Sun, et Qu 2009)
- Extraction avec l'acétate d'éthyle, évaporation à sec du solvant, dissolution dans du méthanol - Méthode de Carrez	Précolonne (10 mm x 4 mm, 5 µm) Colonne C18 Thermo HyPURITY (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)	A : eau- acide formique 99,9 : 0,1 v/v B : acétonitrile- acide formique 99,9 : 0,1 v/v Gradient : A augmente de 5 à 9% en 5 min, est maintenu à 9% pendant 10 min, puis augmente à 11% en 7 min puis à 18% en 16 min, est maintenu à 18% pendant 2 min, enfin augmente à 80% en 1 min et est maintenu à 80% pendant 8 min Débit : 0,8 mL/min	Spectromètre de masse Trappe d'ions équipé avec une ionisation par électronébulisation (ESI) en mode négatif et UV : 190-600 nm	Maïs	(Culhaoglu <i>et al.</i> 2011)
	Précolonne (7,5 mm x 4,6 mm, 5 µm) C18 Alltima (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)	A : 1% acide acétique dans l'eau B : 100% acétonitrile Gradient : 19% B entre 0-18 min ; 19-100% B entre 18-60 min ; 100% B de 60 à 75 min Débit : 1 mL/min Temp. de colonne : 30°C	DAD : 320 nm Spectromètre de masse QqQ équipé avec une source API (mode positif et négatif)	Angélique	(Lu <i>et al.</i> 2005)

HPLC					
Purification de l'extrait	Phase stationnaire	Phase mobile et méthode	Détection	Matrice	Référence
Extraction avec l'acétate d'éthyle, évaporation à sec du solvant, dissolution dans du méthanol	RP (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)	A : 0,1% acide acétique dans l'eau B : 0,1% acide acétique dans le méthanol Gradient : 0 min, 4% B ; 18 min, 18% B ; 35 min, 30% B ; 58 min, 42% B ; 70 min, 60% B ; et 10 min supplémentaires pour rincer et équilibrer la colonne. Débit : 0,7 mL/min	PDA 280 nm (acides hydroxybenzoïques) 320 nm (acides hydroxycinnamiques) Spectromètre de masse Q-TOF (mode négatif)	-Son de sorgho et de maïs -Riz	(Chiremba, Rooney, et Beta 2012 ; Qiu, Liu, et Beta 2010)
	RP 18 Purospher STAR (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)	A : 0,1% acide acétique dans l'eau B : méthanol Gradient : 80 : 20 (A : B) de 0 à 24min, 60 : 40 (A : B) de 24 à 27min, 20 : 80 (A : B) de 27 à 36min, et 80 : 20 (A : B) de 36 à 40min Débit : 1 mL/min	UV : 280 nm	Fibres de noix de coco Ecorce et feuilles d'ananas Fibres de kenaf	(Tang <i>et al.</i> 2014)
CPG					
Purification/traitement de l'extrait	Phase stationnaire	Méthode	Détection	Matrice	Référence
Pyrolyse (TMAH):	DB-5 (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm)	40°C (1 min) à 300°C (20 min) à 6°C/min	Spectromètre de masse (Trappe d'ions)	Fibres de chanvre, lin, sisal, abaca et jute	(del Rio <i>et al.</i> 2007)
Pyrolyse	DB-1701 (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm)	50°C (1 min) à 100°C (à 30°C/ min) puis à 290°C (10 min à 6°C/min) Débit : 1 mL/min	Spectromètre de masse (Trappe d'ions)	Fibres et anas de lin	(del Rio <i>et al.</i> 2011)
Pyrolyse	SPB-5 (30 m x 0,32 mm, 0,25 µm)	50°C à 290°C (10 min) à 5°C/min Débit : 1 mL/min	Spectromètre de masse (Trappe d'ions)	Paille de blé	(Hernández <i>et al.</i> 2001)
Dérivation avec BSTFA	HP 5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm)	100 à 270°C (20 min) à 4°C/min	Spectromètre de masse (Impact électronique, quadripôle)	Fibres de caroube	(Owen <i>et al.</i> 2003)
Dérivation avec méthylformate ou éthylformate	Equity-5 (30 m x 0,32 mm, 1 µm)	100°C (2 min) à 200°C (à 10°C/ min) puis à 280°C (à 5°C/min) Débit : 3,5 mL/min	FID	Mélanges étalons	(Citová, Sladkovský, et Solich 2006)

Temp. : Température

RP : Reverse Phase ou en phase inverse. Cela indique que la phase stationnaire est apolaire.

DAD : Diode Array Detector ou détecteur à barrette de diodes

ESI : ElectroSpray Ionization ou ionisation par électronébulisation. Elle se fait par protonation (mode positif) ou déprotonation (mode négatif)

QQQ : triple quadrupole mass spectrometer ou à triple quadripôle

API : Atmospheric Pressure Ionization ou chambre d'ionisation à pression atmosphérique

PDA : PhotoDiode Array ou détecteur à photodiode

Q-TOF : Quadrupole – Time Of Flight ou Spectrometer de masse quadripôle – analyseur à temps de vol

FID : Flame Ionization Detector ou détecteur à ionisation de flamme

I. 4. Concentration et purification des extraits

L'extraction de composés d'intérêt est souvent associée à une étape de purification/concentration afin d'éliminer des impuretés et d'obtenir un extrait enrichi en composé(s) ciblé(s). Nous évoquerons dans cette partie deux techniques majeures : les techniques membranaires et l'adsorption sur support solide.

I.4.1. Séparation membranaire

La séparation ou filtration membranaire est basée sur l'application d'une différence de pression permettant le transfert du solvant à travers une membrane. La taille des pores est la caractéristique assurant la rétention des solutés. Les techniques de séparation sont classées selon la taille des pores, ainsi par ordre décroissantes on distingue : la microfiltration (0,1 à 10 μm), l'ultrafiltration (10 nm à 1 μm), la nanofiltration (quelques nm) et l'osmose inverse (structure dense).

L'ultrafiltration est parmi les techniques classiques qui sont utilisées avant ou après le processus d'extraction, car elle est capable de séparer les macromolécules (fibres alimentaires solubles ou polysaccharides) des composés de plus petite taille (par exemple les phénols, les sucres ou les ions) dans une méthode physico-chimique et non destructive. Dans la littérature, cette méthode était appliquée pour le fractionnement des composés phénoliques récupérés dans les boues issues de la production du vin et leur séparation des autres composants co-extraits (Galanakis, Markouli, et Gekas 2013), pour la concentration et la purification des extraits riches en pectines obtenus de la pulpe de betterave en vue de leur précipitation (Yapo, Wathélet, et Paquot 2007), et de l'autre côté, pour la séparation de la pectine du reste de l'extrait qui est riche en composés phénoliques, dans le traitement des jus de fruits (Gökmen, Acar, et Kahrama 2003 ; Cassano, Donato, et Drioli 2007 ; Cassano *et al.* 2008), et du marc de raisin pressé (Díaz-Reinoso *et al.* 2009). Cette technique était aussi utilisée pour la purification de l'extrait riche en polyphénols issus des feuilles de thé vert (Li *et al.* 2005).

L'ultrafiltration peut être plus efficace et séparer des molécules de plus faibles poids moléculaires, en travaillant sur la solubilité des composants et la résistance de la membrane en terme d'hydrophobicité et de polarité. Selon Galanakis *et al.* (2013), l'ultrafiltration est efficace pour séparer les composés phénoliques des pectines en utilisant des membranes de polysulfone.

L'utilisation d'une membrane de polymère fluoré non polaire est plus efficace pour séparer les différentes classes de composés phénoliques comme les acides hydroxycinnamiques, les anthocyanes et les flavonols.

La nanofiltration permet de séparer efficacement des molécules de faibles poids moléculaires *via* l'exclusion de taille et l'effet de charge. Elle a été intégrée i) dans le prétraitement enzymatique utilisant la laccase pour éliminer les acides phénoliques d'une solution modèle de monosaccharides (Luo *et al.* 2015) ; elle a été aussi appliquée pour ii) concentrer l'acide férulique dans l'hydrolysate obtenu à partir du son de maïs (Zhao *et al.* 2014), et iii) séparer et concentrer les acides hydroxycinnamiques dans l'hydrolysate alcalin obtenu à partir de la paille de riz (le pourcentage en masse des acides hydroxycinnamiques a atteint 91,4 % en mode concentration-diafiltration) (Y, Li *et al.* 2015) .

I.4.2. Adsorption

I.4.2.1. Généralités

L'adsorption est un phénomène de surface par lequel des molécules se fixent sur la surface d'un adsorbant *via* des interactions plus ou moins fortes. On distingue :

- L'adsorption physique ou physisorption : elle est généralement réversible et met en jeu des liaisons faibles, du type forces de Van der Waals.
- L'adsorption chimique ou chimisorption : Elle est souvent irréversible (liaisons covalentes) ou difficilement réversible (liaisons ioniques) et met en jeu des liaisons fortes.

Parmi les propriétés importantes d'un adsorbant, on peut citer notamment sa capacité d'adsorption, sa sélectivité, son aptitude à être régénéré et réutilisé et son inertie chimique. La capacité d'adsorption dépend de propriétés liées à l'adsorbant (taille des particules, porosité, surface d'échange), à l'adsorbé (structure, groupements fonctionnels, pKa, polarité,...) et à la solution (solvant, pH, température, ...). Elle dépend de l'équilibre qui s'établit entre la phase solide et la phase liquide, équilibre qui peut être représenté par le tracé d'isothermes dont l'allure est liée au mécanisme mis en jeu. Les isothermes présentent généralement l'évolution de la quantité de soluté adsorbée par unité de masse d'adsorbant en fonction de la concentration de soluté dans la phase liquide à température constante.

L'IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) classe les isothermes en six types différents (Jeffroy 2010) :

- type I : il est observé pour un milieu qui ne contient que des micropores, ou pour lequel seuls les micropores se remplissent lors de l'adsorption. C'est l'isotherme que l'on observe le plus couramment dans le cas des zéolithes ;
- type II : il caractérise un milieu non poreux ou macroporeux. La première partie de la courbe correspond à une adsorption monomoléculaire, puis se forme une couche multimoléculaire d'épaisseur indéfinie ;
- type III : il caractérise un système proche de celui caractérisé par une isotherme de type II, mais pour lequel les interactions entre le matériau poreux et l'adsorbat sont faibles ;
- type IV : il caractérise en général un matériau mésoporeux pour lequel une première couche d'adsorbat se forme sur la surface interne du matériau, puis l'adsorbat condense à l'intérieur des pores. Contrairement au cas de l'isotherme de type II, on observe un palier de saturation. De plus, le phénomène de condensation n'est en général pas réversible.
- – type V : il est très similaire à l'isotherme de type IV, mis à part que les interactions entre l'adsorbat et le matériau poreux sont faibles. La monocouche qui se forme n'est pas complète lorsque la condensation a lieu à l'intérieur des pores ;
- – type VI : il caractérise un système dans lequel les couches adsorbées se forment les unes après les autres.

La capacité d'adsorption à l'équilibre peut être reliée *via* des modèles mathématiques à la capacité maximale d'adsorption. Les isothermes de Langmuir et de Freundlich sont couramment utilisées pour évaluer l'adsorption des composés phénoliques. L'isotherme de Langmuir est l'équation à deux paramètres la plus utilisée et assume théoriquement, les hypothèses suivantes : adsorption uniforme, affinité du soluté équivalente dans tous les sites d'adsorption, aucune interaction entre les molécules adsorbées, mécanisme unique d'adsorption et formation d'une monocouche sur la surface (Soto et al. 2011). Son équation est la suivante :

$$q_e = \frac{q_m K_L C_e}{1 + K_L C_e}$$

Avec :

q_e : quantité de soluté adsorbée par unité de masse d'adsorbant
à l'équilibre (mg/g)

C_e : concentration du soluté dans le mélange à l'équilibre (mg/L)

q_m : capacité maximale d'adsorption (mg/g)

K_L : constant liée à l'énergie libre d'adsorption (L/mg)

L'isotherme de Freundlich est une équation empirique adaptée pour des systèmes non idéaux avec des surfaces très hétérogènes. Elle ne consiste pas en la formation d'une monocouche mais elle donne souvent une bonne interprétation des données sur une gamme restreinte de concentration (Soto *et al.* 2011). Son équation est la suivante :

$$q_e = K_F (C_{eq})^{1/n}$$

Avec:

q_e : quantité de soluté adsorbée par unité de masse d'adsorbant
à l'équilibre (mg/g)

C_e : concentration du soluté dans le mélange à l'équilibre (mg/L)

K_F : constante indicative de la capacité d'adsorption relative
de l'adsorbant (mg/g)

$1/n$: l'intensité de l'adsorption

Notons qu'il existe différents types d'adsorbants.

- Le charbon actif : il est constitué de petites couches de graphite hydrophobe ayant des surfaces désordonnées, irrégulières et hétérogènes et portant des groupes fonctionnels hydrophiles (Soto *et al.* 2011).

Plusieurs études ont montré qu'il n'est pas sélectif ni efficace pour l'adsorption de l'acide férulique à partir d'un hydrolysate alcalin. Il permet d'adsorber seulement 40 % de la totalité des acides féruliques (Ou *et al.* 2007 ; Salgado *et al.* 2012).

- les résines : on distingue les résines échangeuses d'ions et les résines d'adsorption. ce sont des polymères synthétiques de nature hydrophile ou hydrophobe. Ces adsorbants sont durables, chimiquement inertes et stables, et possèdent une grande capacité d'adsorption, une efficacité et une sélectivité remarquables. Ils sont facilement régénérés et ils ont un faible coût relatif et une toxicité limitée.

Les résines peuvent aussi agir comme des échangeurs d'anions ou de cations. Les résines échangeuses d'ions sont constituées d'une matrice polymère et d'un groupe fonctionnel qui détermine la force de la résine (Soto *et al.* 2011).

Pour l'extraction des polyphénols, des résines polaires ont été utilisées comme les Amberlites XAD7 et XAD16 (sur du marc de raisin, des déchets de pommes et des eaux usées du moulin à huile d'olives), l'Amberlite IRA96 (sur des eaux usées du moulin à huile d'olives). D'autres résines non polaires ont été aussi utilisées comme l'Isolute ENV+ (sur des eaux usées du moulin à huile d'olives) (Bertin *et al.* 2011).

- les adsorbants minéraux comprennent l'argile, la silice et les zéolithes. Ils représentent la capacité d'échange d'ions. L'extraction des composés phénoliques a été étudiée sur la sépiolite à partir des eaux usées du moulin à huile d'olives et des effluents des usines de pâtes ; et sur la boue rouge, la bentonite, les sols volcanique et non-volcanique à partir des eaux usées municipales et industrielles (Soto *et al.* 2011).

Et récemment des ressources biorenouvelables comme les déchets industriels et agricoles font le sujet de plusieurs études pour remplacer les adsorbants ou polymères commerciaux (Soto *et al.* 2011).

I.4.2.2. Les zéolithes

Les zéolithes sont des aluminosilicates cristallins et microporeux appartenant à la classe des tectosilicates. Elles possèdent des canaux et des cavités de dimension moléculaire qui communiquent avec l'extérieur. Les zéolithes sont constituées d'enchaînements de tétraèdres de SiO_4 ou AlO_4 reliés entre eux grâce aux atomes d'oxygène : un atome d'oxygène est commun à 2 tétraèdres.

La Figure I.26 montre un exemple de zéolithe qui correspond au type structural MFI.

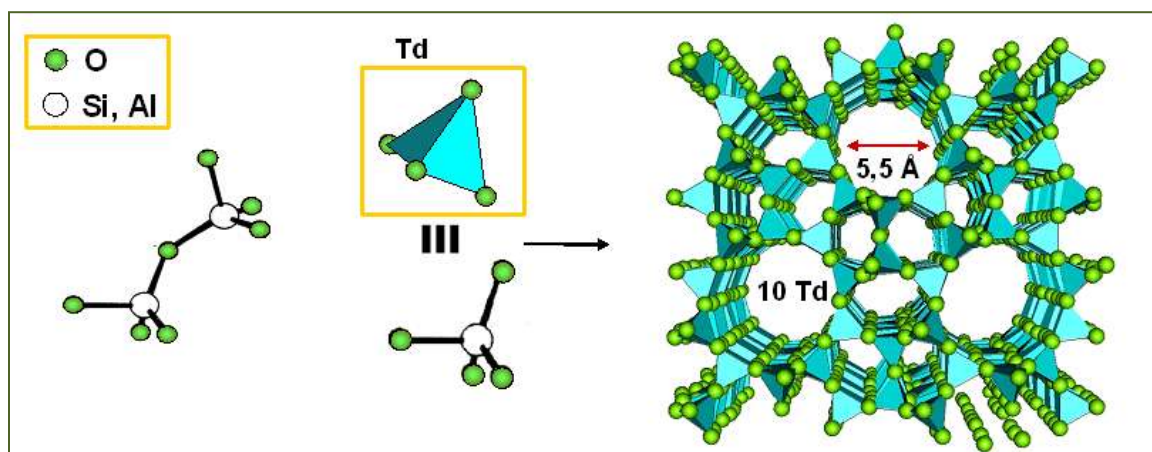
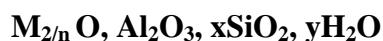


Figure 1.26 : Exemple de la zéolithe de type structural MFI, formée par l'assemblage de tétraèdres (Td) partageant leur sommet (http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Zeolites&lang=1)

Les canaux et les cavités des zéolithes contiennent généralement des molécules d'eau voire des cations ou des sels. La formule générale des zéolithes exprimée en oxyde peut s'écrire :



M représente les cations de valence *n* et *x* est un nombre supérieur ou égal à 5. Le rapport molaire Si/Al peut varier de 1 (valeur minimale) à l'infini.

L'arrangement spatial des tétraèdres SiO_4 et AlO_4 donnent des structures très différentes de zéolithes. Chaque type de structure est caractérisé par un code de trois lettres majuscules défini par la commission structure de l'IZA (*International Zeolite Association*). Une large variété de structures (> 200) est connue aujourd'hui.

Les zéolithes possèdent plusieurs propriétés physico-chimiques remarquables qui leur permettent d'avoir une large gamme d'application :

- une grande aire surfacique atteignant jusqu'à $800 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$
- un volume microporeux pouvant atteindre $0,5 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$
- une dimension des micropores allant de 3 à 13 Å
- une capacité d'échange d'ions
- une surface pouvant être hydrophile ou organophile
- une grande stabilité thermique pouvant aller jusqu'à $1\,000^\circ\text{C}$
- une grande modularité (composition chimique, taille des cristaux)

- une distribution étroite en taille de pores
- une faible toxicité
- la possibilité de régénération.

Le rapport Si/Al dans les zéolites est toujours supérieur ou égal à 1, mais n'a pas de limite supérieure. En règle générale, une zéolite riche en aluminium a une grande affinité pour l'eau et d'autres molécules polaires tandis qu'une zéolite pauvre en aluminium est plutôt hydrophobe et adsorbe de préférence les hydrocarbures. Les zéolithes peuvent être également caractérisées par leur acidité. La différence de valence entre Si et Al aboutit à une zéolithe chargée négativement qui devra être compensée par un cation échangeable (Na^+ , K^+ , Ba^{2+} , Ca^{2+}). Ce qui est à l'origine de la propriété d'échanges d'ions des zéolithes et de l'acidité de ces dernières. La zéolithe est alors un acide de Brönsted. L'acidité dépend du rapport Si/Al ; plus ce dernier est faible, plus la zéolithe est acide.

De ces propriétés émanent trois grands domaines d'application des zéolithes : l'échange d'ions, l'adsorption/séparation et la catalyse. La plupart de ces applications nécessitent des zéolithes synthétiques, les zéolithes naturelles contenant souvent des impuretés.

➤ Echange d'ions

Cette propriété est possible grâce aux cations contenus dans les pores qui peuvent être échangés. Elles sont utilisées pour retenir les gaz polluants de l'atmosphère comme le SO_2 , les nitrosamines à effet cancérigène puissant (Li, Wan, et Zhu 2014), récupérer les ions radioactifs des eaux polluées, éliminer des polluants organiques (Shu *et al.* 1997 ; Xie *et al.* 2012 ; Mateen *et al.* 2015).

➤ Séparation par adsorption sélective

Les différences d'interaction entre les molécules adsorbées et la surface de la zéolithe et les différences de taille entre adsorbat et adsorbant permettent l'adsorption sélective par les zéolithes. Elles sont ainsi employées pour la séparation des constituants de l'air : piéger une partie du CO_2 libéré lors de la production de ciment (Cejka, Corma, et Zones 2010) ou séparer des iso-paraffines à partir de n-paraffines (Rigutto, van Veen, et Huve 2007). Elles sont

également utilisées comme agents déshydratants pour sécher les gaz réfrigérants (Staudt et Thommes 2008).

➤ Catalyse hétérogène

Les zéolithes sont très utilisées en catalyse hétérogène et notamment dans le domaine de l'industrie pétrochimique ou de la bioraffinerie (Primo et Garcia 2014) pour :

- Les réarrangements de liaison carbone-carbone : craquage catalytique et hydrocraquage (exemple : la zéolithe Y), réactions d'isomérisation telles que l'isomérisation des n-alcanes en iso-alcanes (exemple : la Pt-mordénite et la Pt-ZSM-5), l'isomérisation des xylènes en *p*-xylène ayant une meilleure valorisation (Balasamy, Odedairo, et Al-Khattaf 2011) et transformation d'alcanes en alcènes (exemple : la ZSM-5).
- La formation de liaison carbone-carbone par alkylation des composés aromatiques : Cette approche pourrait être utilisée pour les transformations de composés aromatiques et de phénols obtenus à partir de la conversion de la lignine (Bejblova, Prochazkova, et Čejka 2009).
- La fonctionnalisation/défonctionnalisation de matières premières et en particulier les réactions d'oxydation et de désoxygénation, notamment du biocarburant (Kubička et Kikhtyanin 2015 ; Widayatno *et al.* 2015).
- La conversion du méthanol en gasoline (J. Li *et al.* 2015)

L'adsorption des phénols, en tant que polluants ou inhibiteurs réactionnels, a été largement étudiée dans la littérature pour les éliminer du milieu réactionnel *via* des zéolithes (Khalid *et al.* 2004 ; Ahmaruzzaman 2008 ; Koubaissy *et al.* 2011 ; Yonli *et al.* 2011 ; Graça *et al.* 2015 ; Liu *et al.* 2015). En revanche, seule l'étude de (Thiel *et al.* 2013) envisage la valorisation de composés phénoliques à partir d'extraits végétaux au moyen de ces adsorbants.

Grâce à ces diverses propriétés, surtout celles d'adsorption et de séparation, leur grande stabilité thermique et leur faible coût, les zéolithes vont être employées dans une étape innovante de purification et/ou concentration des extraits obtenus lors de notre étude. Le but est de pouvoir valoriser les monomères aromatiques à haute valeur ajoutée contenus dans ces extraits.

I. 5. Conclusion

Même si le chanvre industriel n'occupe aujourd'hui qu'une infime partie de nos surfaces agricoles, ses atouts en font une plante d'avenir. En effet, il constitue une culture et un matériau qui présentent de nombreux intérêts : agronomiques, environnementaux, industriels, énergétiques. Le défibrage industriel de la tige de la plante génère, de façon inévitable, une grande proportion massique de coproduits *i.e.* environ 50 % de chènevotte et 20 % de poudre organique. La composition lignocellulosique avec une teneur en lignine pouvant atteindre 28 %, fait de cette plante une source naturelle potentielle de molécules à haute valeur ajoutée. Associés à la lignine et aux polysaccharides par des liaisons esters et éthers, les acides hydroxycinnamiques, *i.e.* les acides *p*-coumarique et férulique, présentent des propriétés physico-chimiques intéressantes. L'étude bibliographique a permis de recenser les connaissances sur les teneurs en acides hydroxycinnamiques de différentes matières végétales et en particulier de certaines graminées. En revanche aucune donnée n'a été publiée à ce jour concernant le chanvre et ses coproduits. Nous avons choisi de focaliser nos travaux de thèse sur l'acquisition de connaissances sur la répartition des acides férulique et *p*-coumarique dans les deux coproduits sélectionnés. Nous tenterons également d'approfondir leur mode de liaison (sous forme estérifiée ou étherifiée) à la structure lignocellulosique.

L'extraction liquide/solide de ces acides hydroxycinnamiques nécessite l'utilisation de techniques permettant une diffusion efficace du solvant dans la matière végétale. L'efficacité d'extraction dépendra de leur accessibilité qui est liée à leur localisation et au type de liaisons engagées avec la structure lignocellulosique. Le choix du procédé, et des conditions opératoires telles que le solvant d'extraction, les réactifs, la température, ou encore le pH sont déterminants pour optimiser les rendements d'extraction en molécules cibles. L'état de l'art ne fait ressortir aucune étude sur l'extraction des acides hydroxycinnamiques du chanvre. Néanmoins, des travaux ont déjà porté sur d'autres matières premières comme la paille de riz, le blé ou le lin. Les méthodes d'extraction des acides férulique et *p*-coumarique sont principalement des méthodes conventionnelles d'hydrolyse alcaline ou acide en batch à l'échelle analytique. Nous avons fait le choix d'orienter nos travaux sur deux procédés innovants non conventionnels, l'un en batch l'autre en continu : l'extraction assistée par micro-ondes et l'extrusion bi-vis. Ces deux procédés seront comparés.

L'extraction de composés d'intérêts est souvent associée à une étape de purification ou d'enrichissement afin d'obtenir un extrait concentré en composés ciblés. Cet enrichissement peut être notamment réalisé par adsorption *via* des supports de nature différente comme des résines, des argiles ou encore des charbons actifs. Les zéolithes apparaissent comme des adsorbants innovants dans le cadre de nos travaux pour mieux valoriser les extraits issus des fractionnements par micro-ondes ou par extrusion bi-vis des deux coproduits du chanvre.

L'état de l'art montre que l'HPLC est, parmi les méthodes chromatographiques, la plus utilisée pour l'identification et la quantification des acides hydroxycinnamiques cibles. Nous mettrons en œuvre cette méthode pour la caractérisation et le suivi des différents milieux.

Au cours de ce travail bibliographique trois questions majeures sont apparues :

- 1) Quelle est la répartition intrinsèque des acides hydroxycinnamiques de la chènevotte et de la poudre organique ?
- 2) Quel procédé d'extraction efficace des acides hydroxycinnamiques est-il possible de mettre en œuvre pour chacun des coproduits ?
- 3) Les zéolithes sont-elles performantes pour l'enrichissement des extraits ?

Nous tenterons de répondre à ces questions en articulant le travail de thèse en trois parties :

- Caractérisation physico-chimique de deux coproduits de la filière chanvre et détermination de leur potentiel en acides hydroxycinnamiques
- Fractionnement de la chènevotte et de la poudre organique pour l'obtention d'extraits d'acides hydroxycinnamiques
- Concentration des extraits *via* des zéolithes.

I. 6. Références

- Abot, A., 2010. "Caractérisation des fibres longues de chanvre (*Cannabis sativa*) en vue de leurs utilisations dans des matériaux composites." Thèse, Université de Poitiers.
- Acosta-Estrada, B.A., Gutiérrez-Uribe, J.A., Serna-Saldívar, S.O., 2014. "Bound phenolics in foods, a review." *Food Chem.* 152, 46–55.
- Adeboye, P.T., Bettiga, M., Olsson, L., 2014. "The chemical nature of phenolic compounds determines their toxicity and induces distinct physiological responses in *Saccharomyces cerevisiae* in lignocellulose hydrolysates." *AMB Express* 4, 46.
- Adom, K.K., Liu, R.H., 2002. "Antioxidant activity of grains." *J. Agric. Food Chem.* 50, 6182–6187.
- Ahmaruzzaman, M., 2008. "Adsorption of phenolic compounds on low-cost adsorbents: a review." *Adv. Colloid Interface Sci.* 143, 48–67.
- Akihisa, T., Yasukawa, K., Yamaura, M., Ukiya, M., Kimura, Y., Shimizu, N., Arai, K., 2000. "Triterpene alcohol and sterol ferulates from rice bran and their anti-inflammatory effects." *J. Agric. Food Chem.* 48, 2313–2319.
- Akil, Hm., Omar, M., Mazuki, A., Safiee, S., Ishak, Z., Bakar, A.A., 2011. "Kenaf fiber reinforced composites: a review." *Mater. Des.* 32, 4107–4121.
- Akin, D.E., 1995. "Microspectrophotometric characterization of aromatic constituents in cell walls of hard and soft wheats." *J. Sci. Food Agric.* 68, 207–214.
- Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J., Mason, T., 2004. "Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry." *Ultrason. Sonochem.* 11, 261–265.
- Alfaro, M.J., Bélanger, J.M., Padilla, F.C., Paré, J.J., 2003. "Influence of solvent, matrix dielectric properties, and applied power on the liquid-phase microwave-assisted processes (MAPTM) extraction of ginger (*Zingiber officinale*)." *Food Res. Int.* 36, 499–504.
- Amen-Chen, C., Pakdel, H., Roy, C., 2001. "Production of monomeric phenols by thermochemical conversion of biomass: a review. Bioresour." *Technol.* 79, 277–299.
- Anderson, W.F., Peterson, J., Akin, D.E., Morrison III, W.H., 2005. "Enzyme pretreatment of grass lignocellulose for potential high-value co-products and an improved fermentable substrate." Presented at the *Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*, Springer, pp. 303–310.
- Anwar, F., Latif, S., Ashraf, M., 2006. "Analytical characterization of hemp (*Cannabis sativa*) seed oil from different agro-ecological zones of Pakistan." *J. Am. Oil Chem. Soc.* 83, 323–329.
- Bag, R., 2010. "Solvants pariétaux et aptitude à la transformation des fibres de chanvre." Thèse, Université de Reims Champagne-Ardenne
- Bag, R., Beaugrand, J., Dole, P., Kurek, B., 2011. "Viscoelastic properties of woody hemp core." *Holzforschung* 65, 239–247.
- Baiano, A., Bevilacqua, L., Terracone, C., Contò, F., Del Nobile, M.A., 2014. "Single and interactive effects of process variables on microwave-assisted and conventional extractions of antioxidants from vegetable solid wastes." *J. Food Eng.* 120, 135–145.
- Balasamy, R., Odedairo, T., Al-Khattaf, S., 2011. "Unique catalytic performance of mesoporous molecular sieves containing zeolite units in transformation of m-xylene." *Appl. Catal. Gen.* 409, 223–233.

- Banoub, Joseph, Guo-Hua Delmas, Nicolas Joly, Grahame Mackenzie, Nadja Cachet, Bouchra Benjelloun-Mlayah, Michel Delmas. 2015. "A Critique on the Structural Analysis of Lignins and Application of Novel Tandem Mass Spectrometric Strategies to Determine Lignin Sequencing." *Journal of Mass Spectrometry* 50 (1): 5–48.
- Barberousse, Helene, Olivier Roiseux, Christelle Robert, Michel Paquot, Claude Deroanne, Christophe Blecker. 2008. "Analytical Methodologies for Quantification of Ferulic Acid and Its Oligomers." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88 (9): 1494–1511.
- Bauer, Jonas Lewin, Britta Harbaum-Piayda, Karin Schwarz. 2012. "Phenolic Compounds from Hydrolyzed and Extracted Fiber-Rich by-Products." *LWT-Food Science and Technology* 47 (2): 246–54.
- Beejmohun, Vickram, Ophélie Fliniaux, Eric Grand, Frédéric Lamblin, Lamine Bensaddek, Philippe Christen, José Kovensky, Marc-André Fliniaux, François Mesnard. 2007. "Microwave-assisted Extraction of the Main Phenolic Compounds in Flaxseed." *Phytochemical Analysis* 18 (4): 275–82.
- Bejblova, Martina, Dana Prochazkova, Jiří Čejka. 2009. "Acylation Reactions over Zeolites and Mesoporous Catalysts." *ChemSusChem* 2 (6): 486–99.
- Berka-Zougali, Baya, Mohamed-Amine Ferhat, Aicha Hassani, Farid Chemat, Karim S Allaf. 2012. "Comparative Study of Essential Oils Extracted from Algerian Myrtus Communis L. Leaves Using Microwaves and Hydrodistillation." *International Journal of Molecular Sciences* 13 (4): 4673–95.
- Bertin, Lorenzo, Francesco Ferri, Alberto Scoma, Leonardo Marchetti, Fabio Fava. 2011. "Recovery of High Added Value Natural Polyphenols from Actual Olive Mill Wastewater through Solid Phase Extraction." *Chemical Engineering Journal* 171 (3): 1287–93.
- Bertrams, Julia, Nadine Kunz, Margit Müller, Dietmar Kammerer, Florian Conrad Stintzing. 2013. "Phenolic Compounds as Marker Compounds for Botanical Origin Determination of German Propolis Samples Based on TLC and TLC-MS." *Journal of Applied Botany and Food Quality* 86 (1).
- Bonatti, Piera Medeghini, Chiara Ferrari, Bonaventura Focher, Carmen Grippo, Giangiacomo Torri, Cesare Cosentino. 2004. "Histochemical and Supramolecular Studies in Determining Quality of Hemp Fibres for Textile Applications." *Euphytica* 140 (1-2): 55–64.
- Botineau, Michel. 2010. *Systematic and Applied Botany of Flowering Plants*. Technique et Documentation Lavoisier.
- Boulloc, Pierre. 2006. *Le Chanvre Industriel: Production et Utilisations*. France Agricole Editions, Paris.
- Bourmaud, Alain, Claudine Morvan, Anis Bouali, Vincent Placet, Patrick Perré, Christophe Baley. 2013. "Relationships between Micro-Fibrillar Angle, Mechanical Properties and Biochemical Composition of Flax Fibers." *Industrial Crops and Products* 44: 343–51.
- Bouvier, JM, P Guyomard. 1997. "Method and Installation for Continuous Extraction of a Liquid Contained in a Raw Material." *French Patent PCT/FR97/00696, Assigned to Clextral (November 21, 1997)*.
- Boz, Huseyin. 2015. "p-Coumaric acid in cereals: presence, antioxidant and antimicrobial effects". *International Journal of Food Science & Technology*, vol. 50(11), p. 2323-2328.

- Bozell, Joseph J. 2008. "Feedstocks for the Future—biorefinery Production of Chemicals from Renewable Carbon." *CLEAN—Soil, Air, Water* 36 (8): 641–47.
- Bremer, B, K Bremer, MW Chase, JL Reveal, DE Soltis, PS Soltis, PF Stevens, AA Anderberg, MF Fay, P Goldblatt. 2003. "An Update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the Orders and Families of Flowering Plants: APG II." *Botanical Journal of the Linnean Society* 141: 399–436.
- Buranov, Anvar U, G Mazza. 2008. "Lignin in Straw of Herbaceous Crops." *Industrial Crops and Products* 28 (3): 237–59.
- Buranov, Anvar U, G Mazza. 2009. "Extraction and Purification of Ferulic Acid from Flax Shives, Wheat and Corn Bran by Alkaline Hydrolysis and Pressurised Solvents." *Food Chemistry* 115 (4): 1542–48.
- CAB des Pays de la Loire. 2015. "Coordination AgroBiologique Des Pays de La Loire, http://www.biopaysdelaloire.fr/documents_blocs/71.pdf. Dernière Consultation En Avril 2015."
- Callaway, JC. 2004. "Hempseed as a Nutritional Resource: An Overview." *Euphytica* 140 (1-2): 65–72.
- Callaway, J, U Schwab, I Harvima, P Halonen, O Mykkänen, P Hyvönen, T Järvinen. 2005. "Efficacy of Dietary Hempseed Oil in Patients with Atopic Dermatitis" 16 (2): 87–94.
- Capriotti, Anna Laura, Chiara Cavaliere, Patrizia Foglia, Susy Piovesana, Salvatore Ventura. 2015. "Chromatographic Methods Coupled to Mass Spectrometry Detection for the Determination of Phenolic Acids in Plants and Fruits." *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 38 (3): 353–70.
- Cassano, A, L Donato, C Conidi, E Drioli. 2008. "Recovery of Bioactive Compounds in Kiwifruit Juice by Ultrafiltration." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 9 (4): 556–62.
- Cassano, A, L Donato, E Drioli. 2007. "Ultrafiltration of Kiwifruit Juice: Operating Parameters, Juice Quality and Membrane Fouling." *Journal of Food Engineering* 79 (2): 613–21.
- Cejka, Jiri, Avelino Corma, Stacey Zones. 2010. *Zeolites and Catalysis: Synthesis, Reactions and Applications*. John Wiley & Sons.
- CELC. 2015. "La Confédération Européenne Du Lin et Du Chanvre, <Http://www.mastersoflinen.com/>. Dernière Consultation En Avril 2015."
- Cellay, Clément. 2013. "Fractionnement de Coproduits de Pin Maritime (*Pinus Pinaster*) et de Peuplier (*Populus Tremula*) Pour L'obtention D'extraits Polyphénoliques À Activité Antioxydante: Procédé D'extraction Aqueuse En Extracteur Bi-Vis et Étude Des Conditions Subcritiques." Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- CETIN-KARACA, Hayriye. 2011. Evaluation of natural antimicrobial phenolic compounds against foodborne pathogens. University of Kentucky Master's Theses.
- Chabrat, Elodie. 2012. "Développement de Nouvelles Formulations D'agromatériaux Thermoplastiques Par Mélange En Extrudeur Bivis de Céréales et de Polymères Issus de Ressources Renouvelables." Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Chemat, Farid, Natacha Rombaut, Anne-Sylvie Fabiano-Tixier, Jean T Pierson, Antoine Bily. 2015. "Green Extraction: From Concepts to Research, Education, and Economical Opportunities." *Green Extraction of Natural Products: Theory and Practice*, 1–36.
- Chen, Sau Soon, Michael Spiro. 1995. "Kinetics of Microwave Extraction of Rosemary Leaves in Hexane, Ethanol and a Hexane+ Ethanol Mixture." *Flavour and Fragrance Journal* 10 (2): 101–12.

- Chiremba, Constance, Lloyd W Rooney, Trust Beta. 2012. "Microwave-Assisted Extraction of Bound Phenolic Acids in Bran and Flour Fractions from Sorghum and Maize Cultivars Varying in Hardness." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (18): 4735–42.
- Citová, Ivana, Radek Sladkovský, Petr Solich. 2006. "Analysis of Phenolic Acids as Chloroformate Derivatives Using Solid Phase Microextraction–gas Chromatography." *Analytica Chimica Acta* 573: 231–41.
- Cojocaru, P, Matei Macoveanu. 2011. "Decontamination of Polluted Soil with Cadmium and Zinc Using Greenhouse Phytoremediation." *Environmental Engineering and Management Journal* 10 (3): 349–55.
- Colas, Dorothee. 2012. "Etude de La Bioraffinerie Des Plantes Vertes: Application Au Fractionnement Des Protéines de Luzerne Par Extrusion Bi-Vis et Chromatographie Hydrophobe." Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Collin, Guy J, Hélène Deslauriers, Nathalie Pageau, Michel Gagnon. 1993. "Essential Oil of Tansy (*Tanacetum Vulgare* L.) of Canadian Origin." *Journal of Essential Oil Research* 5 (6): 629–38.
- Collin, Sonia, Jean Crouzet. 2011. *Polyphénols et Procédés: Transformation Des Polyphénols Au Travers Des Procédés Appliqués À L'agro-Alimentaire*. Lavoisier.
- Cornu, A, JM Besle, P Mosoni, E Grenet. 1994. "Lignin-Carbohydrate Complexes in Forages: Structure and Consequences in the Ruminant Degradation of Cell-Wall Carbohydrates." *Reproduction Nutrition Development* 34 (5): 385–98.
- Correia, Fatima, DN Roy, Krishan Goel. 2001. "Chemistry and Delignification Kinetics of Canadian Industrial Hemp." *Journal of Wood Chemistry and Technology* 21 (2): 97–111.
- Crônier, David, Bernard Monties, Brigitte Chabbert. 2005. "Structure and Chemical Composition of Bast Fibers Isolated from Developing Hemp Stem." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (21): 8279–89.
- Culhaoglu, Tanya, Dan Zheng, Valérie Méchin, Stéphanie Baumberger. 2011. "Adaptation of the Carrez Procedure for the Purification of Ferulic and P-Coumaric Acids Released from Lignocellulosic Biomass prior to LC/MS Analysis." *Journal of Chromatography B* 879 (28): 3017–22.
- Dahmoune Farid, Kayak Balunkeswar, Kamal Moussi, Hocine Remini, Khodir Madani. 2014. "Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Polyphenols from *Myrtus Communis* L. Leaves."
- Dahmoune, Farid, Balunkeswar Nayak, Kamal Moussi, Hocine Remini, Khodir Madani. 2015. "Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Polyphenols from *Myrtus Communis* L. Leaves." *Food Chemistry* 166: 585–95.
- Dahmoune, Farid, Giorgia Spigno, Kamal Moussi, Hocine Remini, Asma Cherbal, Khodir Madani. 2014. "Pistacia Lentiscus Leaves as a Source of Phenolic Compounds: Microwave-Assisted Extraction Optimized and Compared with Ultrasound-Assisted and Conventional Solvent Extraction." *Industrial Crops and Products* 61: 31–40.
- Dambroth, Manfred, Reinhard Seehuber. 1988. "Flax: Breeding, Cultivation and Processing." Eugen Ulmer.
- De Choudens, C, JL Perrin. 1996. "L'extrusion Dans La Fabrication Des Pâtes Papetières : Données Techniques et Économiques Pour Un Transfert de Technologie Réussi." In: 40 Ans D'extrusion Bi-Vis Chez Clextal. Clextal, Firminy, France.

- Del Rio, José C, Ana Gutiérrez, Isabel M Rodriguez, David Ibarra, Angel T Martinez. 2007. "Composition of Non-Woody Plant Lignins and Cinnamic Acids by Py-GC/MS, Py/TMAH and FT-IR." *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 79 (1): 39–46.
- Del Rio, José C, Jorge Rencoret, Ana Gutiérrez, Lidia Nieto, Jesus Jiménez-Barbero, Angel T Martinez. 2011. "Structural Characterization of Guaiacyl-Rich Lignins in Flax (*Linum Usitatissimum*) Fibers and Shives." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (20): 11088–99.
- Del Rio, Jose C, Jorge Rencoret, Gisela Marques, Jiebing Li, Göran Gellerstedt, Jesús Jiménez-Barbero, Ángel T Martínez, Ana Gutiérrez. 2009. "Structural Characterization of the Lignin from Jute (*Corchorus Capsularis*) Fibers." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (21): 10271–81.
- De Vasconcelos Silva, MG, AA Craveiro, FJ Abreu Matos, MIL Machado, JW Alencar. 1999. "Chemical Variation during Daytime of Constituents of the Essential Oil of *Ocimum Gratissimum* Leaves." *Fitoterapia* 70 (1): 32–34.
- Díaz-Reinoso, Beatriz, Andrés Moure, Herminia Domínguez, Juan Carlos Parajó. 2009. "Ultra- and Nanofiltration of Aqueous Extracts from Distilled Fermented Grape Pomace." *Journal of Food Engineering* 91 (4): 587–93.
- Dittenber, David B, Hota VS GangaRao. 2012. "Critical Review of Recent Publications on Use of Natural Composites in Infrastructure." *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* 43 (8): 1419–29.
- Du Bos d'Elbheq, C, P Faudet. 1862. *Le Père Fargeau, Ou La Famille Du Peigneur de Chanvre*. Hachette.
- Dufaure, Corinne, Juliette Leyris, Luc Rigal, Zéphirin Mouloungui. 1999. "A Twin-Screw Extruder for Oil Extraction: I. Direct Expression of Oleic Sunflower Seeds." *Journal of the American Oil Chemists' Society* 76 (9): 1073–79.
- Dufaure, Corinne, Zéphirin Mouloungui, Luc Rigal. 1999. "A Twin-Screw Extruder for Oil Extraction: II. Alcohol Extraction of Oleic Sunflower Seeds." *Journal of the American Oil Chemists' Society* 76 (9): 1081–86.
- Duh, Pin-Der, Gow-Chin Yen, Wen-Jye Yen, Lee-Wen Chang. 2001. "Antioxidant Effects of Water Extracts from Barley (*Hordeum Vulgare* L.) Prepared under Different Roasting Temperatures." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (3): 1455–63.
- Dupeyre, D, MR Vignon. 1998. "Fibres from Semi-Retted Hemp Bundles by Steam Explosion Treatment." *Biomass and Bioenergy* 14 (3): 251–60.
- Duthon, Audrey. 2014. "Appua La Structuration de La Filiere Chanvre Pour L'écoconstruction Dans Le Gard." Thèse. Fédération Départementale des CIVAM du Gard, Domaine de Puechlong, 30160 St Nazaire des Gardies.
- EIHA. 2015. "European Industrial Hemp Association, Eiha.org/. Dernière Consultation En Avril 2015."
- Escribano-Bailon, Maria Teresa, Celestino Santos-Buelga. 2003. "Polyphenol Extraction from Foods." *Methods in Polyphenol Analysis*, 1–16.
- Evon, Philippe. 2008. "Nouveau Procédé de Bioraffinage Du Tournesol Plante Entière Par Fractionnement Thermo-Mécano-Chimique En Extrudeur Bi-Vis: Étude de L'extraction Aqueuse Des Lipides et de La Mise En Forme Du Raffinat En Agromatériaux Par Thermomoulage." Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Evon, Philippe, Virginie Vandenbossche, Pierre-Yves Pontalier, Luc Rigal. 2010. "La Technologie D'extrusion Bi-Vis, Une Solution Originale et Performante Pour Le

- Bioraffinage Du Tournesol Plante Entière.” *Oléagineux, Corps Gras, Lipides* 17 (6): 404–17.
- Evon, Ph, Virginie Vandenbossche, Pierre Yves Pontalier, Luc Rigal. 2007. “Direct Extraction of Oil from Sunflower Seeds by Twin-Screw Extruder according to an Aqueous Extraction Process: Feasibility Study and Influence of Operating Conditions.” *Industrial Crops and Products* 26 (3): 351–59.
- Evon, Ph, Virginie Vandenbossche, Pierre Yves Pontalier, Luc Rigal. 2009. “Aqueous Extraction of Residual Oil from Sunflower Press Cake Using a Twin-Screw Extruder: Feasibility Study.” *Industrial Crops and Products* 29 (2): 455–65.
- Faye, Mamadou. 2010. “Nouveau Procédé de Fractionnement de La Graine de Neem (*Azadirachta Indica* A. Jussi) Sénégalais: Production D’un Bio-Pesticide D’huile et de Tourteau.” Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Fidelis, Maria Ernestina Alves, Thatiana Vitorino Castro Pereira, Otávio da Fonseca Martins Gomes, Flávio de Andrade Silva, Romildo Dias Toledo Filho. 2013. “The Effect of Fiber Morphology on the Tensile Strength of Natural Fibers.” *Journal of Materials Research and Technology* 2 (2): 149–57.
- Filly, Aurore, Xavier Fernandez, Matteo Minuti, Francesco Visinoni, Giancarlo Cravotto, Farid Chemat. 2014. “Solvent-Free Microwave Extraction of Essential Oil from Aromatic Herbs: From Laboratory to Pilot and Industrial Scale.” *Food Chemistry* 150: 193–98.
- Finell, Michael. 2003. *The Use of Reed Canary-Grass (Phalaris Arundinacea) as a Short Fibre Raw Material for the Pulp and Paper Industry*. Vol. 424.
- Franck, R. R. 2005. *Bast and Other Plant Fibres*. Elsevier.
- Fujioka, Kazutoshi, Takayuki Shibamoto. 2006. “Quantitation of Volatiles and Nonvolatile Acids in an Extract from Coffee Beverages: Correlation with Antioxidant Activity.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (16): 6054–58.
- Galanakis, Charis M, Eleftheria Markouli, Vassilis Gekas. 2013. “Recovery and Fractionation of Different Phenolic Classes from Winery Sludge Using Ultrafiltration.” *Separation and Purification Technology* 107: 245–51.
- Gallardo, C, L Jimenez, M-T Garcia-Conesa. 2006. “Hydroxycinnamic Acid Composition and in Vitro Antioxidant Activity of Selected Grain Fractions.” *Food Chemistry* 99 (3): 455–63.
- Gandolfi, Stefano, Gianluca Ottolina, Sergio Riva, Giuseppe Pedrocchi Fantoni, Ilabahren. Patel. 2013. “Complete Chemical Analysis of Carmagnola Hemp Hurds and Structural Features of Its Components.” *BioResources* 8: 2641–56, 16 pp.
- Geneau-Sbartaï, Céline. 2006. “Procédé D’élaboration D’agromatériau Composite Naturel Par Extrusion Bivis et Injection Moulage de Tourteau de Tournesol.” Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Girouard, P, Mehdi, B, Samson, R. 1999. “Évaluation de La Culture Du Chanvre Dans La Région de l’Estrie.”
- Godin, Bruno, François Ghysel, Richard Agneessens, Thomas Schmit, Sébastien Gofflot, Stéphane Lamaudière, Georges Sinnaeve, Jean-Pierre Goffart, Patrick A Gerin, Didier Stilmant. 2010. “Détermination de La Cellulose, Des Hémicelluloses, de La Lignine et Des Cendres Dans Diverses Cultures Lignocellulosiques Dédiées À La Production de Bioéthanol de Deuxième Génération.” *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 14 (s2): 549–60.

- Gokmen Vural, Acar Jale , Kahraman Nermin . 2003. "Influence of Conventional Clarification and Ultrafiltration on the Phenolic Composition of Golden Delicious Apple Juice." *Journal of Food Quality* 26 (3): 257–66
- Golmakani, Mohammad-Taghi, Karamatollah Rezaei. 2008. "Comparison of Microwave-Assisted Hydrodistillation With the Traditional Hydrodistillation Method in the Extraction of Essential Oils from *Thymus Vulgaris* L." *Food Chemistry* 109 (4): 925–30.
- Gonçalves, Cristina, Teresa Dinis, Maria Teresa Batista. 2005. "Antioxidant Properties of Proanthocyanidins of *Uncaria Tomentosa* Bark Decoction: A Mechanism for Anti-Inflammatory Activity." *Phytochemistry* 66 (1): 89–98.
- González-García, Sara, Lin Luo, M^a Teresa Moreira, Gumersindo Feijoo, Gjalt Huppes. 2012. "Life Cycle Assessment of Hemp Hurds Use in Second Generation Ethanol Production." *Biomass and Bioenergy* 36: 268–79.
- Graça, I, AM Carmo, JM Lopes, MF Ribeiro. 2015. "Improving HZSM-5 Resistance to Phenolic Compounds for the Bio-oils/FCC Feedstocks Co-Processing." *Fuel* 140: 484–94.
- Graf, Ernst. 1992. "Antioxidant Potential of Ferulic Acid." *Free Radical Biology and Medicine* 13 (4): 435–48.
- Grigoryev, S. 2002. "Hemp Germplasm Breeding Sticks in Aspects of Fatty Acid Profile and Tocopherols. Possible Usage in Medicine as Antioxidants." *Expo-Hemp 2002, Switzerland*.
- Gruber, Patrick R, Michael Kamm, Birgit Kamm. 2006. *Biorefineries: Industrial Processes and Products: Status Quo and Future Directions*. Wiley-VCH.
- Guignard, Jean-Louis, Pierre Potier. 2000. *Biochimie Végétale*. Dunod.
- Guo, Tao, Yi Sun, Yin Sui, Famei Li. 2003. "Determination of Ferulic Acid and Adenosine in *Angelicae Radix* by Micellar Electrokinetic Chromatography." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 375 (6): 840–43.
- Guyomard, P. 1994. "Étude de Faisabilité D'un Extrudeur Bi-Vis En Pressage-Extrusion de Graines Oléagineuses." Thèse, université de Compiègne.
- Han, James S. 1998. "Properties of Nonwood Fibers." In , 3–12.
- Haveren, Jacco van, Elinor L Scott, Johan Sanders. 2008. "Bulk Chemicals from Biomass." *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 2 (1): 41–57.
- Hemphill, John K, Jocelyn C Turner, Paul G Mahlberg. 1980. "Cannabinoid Content of Individual Plant Organs from Different Geographical Strains of *Cannabis Sativa* L." *Journal of Natural Products* 43 (1): 112–22.
- Hernández, M, MJ Hernández-Coronado, MD Montiel, J Rodríguez, MI Pérez, P Bocchini, GC Galletti, ME Arias. 2001. "Pyrolysis/gas Chromatography/mass Spectrometry as a Useful Technique to Evaluate the Ligninolytic Action of Streptomyces on Wheat Straw." *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 58: 539–51.
- Holladay, JE, JJ Bozell, JF White, D Johnson. 2007. "Top Value-Added Chemicals from Biomass." *DOE Report PNNL 16983*.
- Ho, Mei-po, Hao Wang, Joong-Hee Lee, Chun-kit Ho, Kin-tak Lau, Jinsong Leng, David Hui. 2012. "Critical Factors on Manufacturing Processes of Natural Fibre Composites." *Composites Part B: Engineering* 43 (8): 3549–62.
- Huang, Hsueh Meei, Gary L Johannig, Boyd L O'Dell. 1986. "Phenolic Acid Content of Food Plants and Possible Nutritional Implications." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 34 (1): 48–51.

- Isobe, S, F Zuber, K Uemura, A Noguchi. 1992. "A New Twin-Screw Press Design for Oil Extraction of Dehulled Sunflower Seeds." *Journal of the American Oil Chemists Society* 69 (9): 884–89.
- Jeffroy, Marie. 2010. "Simulation Moléculaire Des Propriétés Des Zéolithes Cationiques: Propriétés Thermodynamiques et Propriétés Structurales." Thèse, Université Paris Sud-Paris XI.
- John, M.J., Thomas, S., Clark, J. H., 2012. *Natural Polymers: Composites*. Vol. 1. Royal Society of Chemistry.
- Jorda, J. 2003. "Etude Du Procédé D'extraction Alcaline et de Purification de Pectines de Pulpe de Betterave : Étude Des Propriétés Chimiques et Physico-Chimiques." Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Karami, Leila, Jörg Fromm, Gerald Koch, Olaf Schmidt, Uwe Schmitt. 2014. "Oak Wood Inhabiting Fungi and Their Effect on Lignin Studied by UV Microspectrophotometry." *Maderas. Ciencia Y Tecnología*, no. AHEAD: 0–0.
- Kartika, I Amalia, C Geneau, PY Pontalier, F Silvestre, L Rigal. 2004. "TWIN-SCREW EXTRUSION: A SINGLE STEP FOR THREE TREATMENTS OF SUNFLOWER SEEDS."
- Kartika, I Amalia, PY Pontalier, L Rigal. 2005. "Oil Extraction of Oleic Sunflower Seeds by Twin Screw Extruder: Influence of Screw Configuration and Operating Conditions." *Industrial Crops and Products* 22 (3): 207–22.
- Kartika, I Amalia, PY Pontalier, L Rigal. 2006. "Extraction of Sunflower Oil by Twin Screw Extruder: Screw Configuration and Operating Condition Effects." *Bioresource Technology* 97 (18): 2302–10.
- Kayahara, H, ZHUANG Miao, G Fujiwara. 1998. "Synthesis and Biological Activities of Ferulic Acid Derivatives." *Anticancer Research* 19 (5A): 3763–68.
- Khalid, Mohamed, Guy Joly, Arlette Renaud, Patrick Magnoux. 2004. "Removal of Phenol from Water by Adsorption Using Zeolites." *Industrial & Engineering Chemistry Research* 43 (17): 5275–80.
- Khalil, HPS Abdul, AH Bhat, AF Ireana Yusra. 2012. "Green Composites from Sustainable Cellulose Nanofibrils: A Review." *Carbohydrate Polymers* 87 (2): 963–79.
- Khristova, P, S Bentcheva, I Karar. 1998. "Soda-AQ Pulp Blends from Kenaf and Sunflower Stalks." *Bioresource Technology* 66 (2): 99–103.
- Kim, Jin-Woo, G Mazza. 2006. "Optimization of Extraction of Phenolic Compounds from Flax Shives by Pressurized Low-Polarity Water." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (20): 7575–84.
- Kim, Jin-Woo, G Mazza. 2007. "Mass Transfer during Pressurized Low-Polarity Water Extraction of Phenolics and Carbohydrates from Flax Shives." *Industrial & Engineering Chemistry Research* 46 (22): 7221–30.
- King, Jerry W, Richard D Grabel. 2007. "Isolation of Polyphenolic Compounds from Fruits or Vegetables Utilizing Sub-Critical Water Extraction," April.
- Koch, Gerald. 2004. "Topochemical Characterization of Lignins and Phenolic Extractives in Wood Cell Walls." *Lenzinger Berichte* 83: 6–12.
- Koch, Gerald, Gunnar Kleist. 2001. "Application of Scanning UV Microspectrophotometry to Localise Lignins and Phenolic Extractives in Plant Cell Walls." *Holzforschung* 55 (6): 563–67.

- Koch, G, Grünwald, C . 2004. "Application of UV Microspectrophotometry for the Topochemical Detection of Lignin and Phenolic Extractives in Wood Fibre Cell Walls." *Wood Fibre Cell Walls: Methods to Study Their Formation, Structure and Properties. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala*, 119–30.
- Köhler. 1897. *Book of Medicinal Plants*. Colorado, United States.
- Koubaissy, Bachar, Joumana Toufaily, Maya El-murr, Tayssir Hamieh, Patrick Magnoux, Guy Joly. 2011. "Elimination of Aromatic Pollutants Present in Wastewater by Adsorption over Zeolites." *Physics Procedia* 21: 220–27.
- Kriese, U., E. Schumann, W.E. Weber, M. Beyer, L. Brühl, Matthäus. 2004. "Oil Content, Tocopherol Composition and Fatty Acid Patterns of the Seeds of 51 *Cannabis sativa* L. Genotypes." *Euphytica* 137 (3): 339–51. doi:10.1023/B:EUPH.0000040473.23941.76.
- Krygier, Krzysztof, Frank Sosulski, Lawrence Hogge. 1982. "Free, Esterified, and Insoluble-Bound Phenolic Acids. 1. Extraction and Purification Procedure." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 30 (2): 330–34.
- Kubička, David, Oleg Kikhtyanin. 2015. "Opportunities for Zeolites in Biomass upgrading—Lessons from the Refining and Petrochemical Industry." *Catalysis Today* 243: 10–22.
- Ky, Chin-Long, Michel Noirot, Serge Hamon. 1997. "Comparison of Five Purification Methods for Chlorogenic Acids in Green Coffee Beans (*Coffea* Sp.)." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (3): 786–90.
- Kymäläinen, Hanna-Riitta, Anna-Maija Sjöberg. 2008. "Flax and Hemp Fibres as Raw Materials for Thermal Insulations." *Building and Environment* 43 (7): 1261–69.
- Lacaze-Dufaure, Corinne. 1998. "Fractionnement Du Tournesol Oléique: Expression et Transformations Chimiques Des Triglycérides de Graines En Esters Lubrifiants et Adjuvants En Réacteur Conventionnel et Réacteur Bi-Vis." Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Lapierre, Catherine. 1993. "Application of New Methods for the Investigation of Lignin Structure." *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*, no. foragecellwalls: 133–66.
- Latif, Sajid, Farooq Anwar. 2009. "Physicochemical Studies of Hemp (*Cannabis sativa*) Seed Oil Using Enzyme-assisted Cold-pressing." *European Journal of Lipid Science and Technology* 111 (10): 1042–48.
- Lavoie, Jean-Michel, Romain Beauchet. 2012. "Biorefinery Of *Cannabis sativa* Using One-and Two-Step Steam Treatments for the Production of High Quality Fibres." *Industrial Crops and Products* 37 (1): 275–83.
- Lee, Mei-Hwa, Chuan-Chuan Lin. 2007. "Comparison of Techniques for Extraction of Isoflavones from the Root of Radix Puerariae: Ultrasonic and Pressurized Solvent Extractions." *Food Chemistry* 105 (1): 223–28.
- Lee, Seung-Cheol, Jeong-Han Kim, Seok-Moon Jeong, Dong-Ryul Kim, Jung-Uk Ha, KC Nam, DU Ahn. 2003. "Effect of Far-Infrared Radiation on the Antioxidant Activity of Rice Hulls." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (15): 4400–4403.
- Lempereur, I, X Rouau, J Abecassis. 1997. "Genetic and Agronomic Variation in Arabinoxylan and Ferulic Acid Contents of Durum Wheat (*Triticum durum*L.) Grain and Its Milling Fractions." *Journal of Cereal Science* 25 (2): 103–10.
- Lepifre, Stéphane, Stéphanie Baumberger, Brigitte Pollet, Frédéric Cazaux, Xavier Coqueret, Catherine Lapierre. 2004. "Reactivity of Sulphur-Free Alkali Lignins within Starch Films." *Industrial Crops and Products* 20 (2): 219–30.

- Leyris, J, F Silvestre, L Rigal, A Gaset. 1998. "Procédé de Fabrication D'objets À Partir de Matière Première Végétale Par Formage Ou Thermoformage." *Brevet Français FR 2 784 47*.
- Leyris, Juliette. 1998. "Valorisation Du Tourteau de Tournesol: Etude, Procédé et Modélisation de L'extraction Des Protéines- Exploitation de Leurs Propriétés Fonctionnelles En Vue de L'obtention D'agromatériaux." Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Li, Jianqing, Pengjie Miao, Zhuo Li, Tao He, Dezhi Han, Jingli Wu, Zhiqi Wang, Jinhu Wu. 2015. "Hydrothermal Synthesis of Nanocrystalline H [Fe, Al] ZSM-5 Zeolites for Conversion of Methanol to Gasoline." *Energy Conversion and Management* 93: 259–66.
- Linger, Jeffrey G, Derek R Vardon, Michael T Guarnieri, Eric M Karp, Glendon B Hunsinger, Mary Ann Franden, Christopher W Johnson, Gina Chupka, Timothy J Strathmann, Philip T Pienkos. 2014. "Lignin Valorization through Integrated Biological Funneling and Chemical Catalysis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (33): 12013–18.
- Linger, P, J Müssig, H Fischer, J Kobert. 2002. "Industrial Hemp (*Cannabis sativa* L.) Growing on Heavy Metal Contaminated Soil: Fibre Quality and Phytoremediation Potential." *Industrial Crops and Products* 16 (1): 33–42.
- Li, Ping, Yanhui Wang, Runyu Ma, Xiaolin Zhang. 2005. "Separation of Tea Polyphenol from Green Tea Leaves by a Combined CATUFM-Adsorption Resin Process." *Journal of Food Engineering* 67 (3): 253–60.
- Lips, Steef JJ, Goretti M Iniguez de Heredia, Richard GM Op den Kamp, Jan EG van Dam. 2009. "Water Absorption Characteristics of Kenaf Core to Use as Animal Bedding Material." *Industrial Crops and Products* 29 (1): 73–79.
- Li, Si-Yu, James D Stuart, Yi Li, Richard S Parnas. 2010. "The Feasibility of Converting *Cannabis sativa* L. Oil into Biodiesel." *Bioresource Technology* 101 (21): 8457–60.
- Liu, Li, Xin Zhou, Chun Wang, Qiuhua Wu, Zhi Wang. 2015. "Extraction and Enrichment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Ordered Mesoporous Carbon Reinforced Hollow Fiber Liquid-phase Microextraction." *Journal of Separation Science*.
- Liu, Zhilan, Juan Wang, Pingniang Shen, Chengyun Wang, Yongjia Shen. 2006. "Microwave-Assisted Extraction and High-Speed Counter-Current Chromatography Purification of Ferulic Acid from Radix Angelicae Sinensis." *Separation and Purification Technology* 52 (1): 18–21.
- Li, Yan Yan, Mi Mi Wan, Jian Hua Zhu. 2014. "Cleaning Carcinogenic Nitrosamines with Zeolites." *Environmental Chemistry Letters* 12 (1): 139–52.
- Li, Ying, Anne Sylvie Fabiano-Tixier, Maryline Abert Vian, Farid Chemat. 2013. "Solvent-Free Microwave Extraction of Bioactive Compounds Provides a Tool for Green Analytical Chemistry." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 47: 1–11.
- Li, Yun, Benkun Qi, Jianquan Luo, Rashid Khan, Yinhua Wan. 2015. "Separation and Concentration of Hydroxycinnamic Acids in Alkaline Hydrolyzate from Rice Straw by Nanofiltration." *Separation and Purification Technology* 149: 315–21.
- Lucchesi, Marie E, Farid Chemat, Jacqueline Smadja. 2004. "Solvent-Free Microwave Extraction of Essential Oil from Aromatic Herbs: Comparison with Conventional Hydro-Distillation." *Journal of Chromatography A* 1043 (2): 323–27.
- Lucchesi, Marie-Elisabeth. 2005. "Extraction Sans Solvant Assistée Par Micro-Ondes Conception et Application À L'extraction Des Huiles Essentielles." Thèse, Université de la Réunion.

- Lu, Guang-Hua, Kelvin Chan, Kelvin Leung, Chi-Leung Chan, Zhong-Zhen Zhao, Zhi-Hong Jiang. 2005. "Assay of Free Ferulic Acid and Total Ferulic Acid for Quality Assessment of *Angelica Sinensis*." *Journal of Chromatography A* 1068 (2): 209–19.
- Luo, Jianquan, Birgitte Zeuner, Sofie T Morthensen, Anne S Meyer, Manuel Pinelo. 2015. "Separation of Phenolic Acids from Monosaccharides by Low-Pressure Nanofiltration Integrated with Laccase Pre-Treatments." *Journal of Membrane Science* 482: 83–91.
- Luque De Castro, MD, MM Jimenez-Carmona, V Fernandez-Perez. 1999. "Towards More Rational Techniques for the Isolation of Valuable Essential Oils from Plants." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 18 (11): 708–16.
- Lu, Xiaonan, Jun Wang, Hamzah M Al-Qadiri, Carolyn F Ross, Joseph R Powers, Juming Tang, Barbara A Rasco. 2011. "Determination of Total Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Onion (*Allium Cepa*) and Shallot (*Allium Oschaninii*) Using Infrared Spectroscopy." *Food Chemistry* 129 (2): 637–44.
- Mabinya, Leonard Vuyani, Tungamirai Mafunga, John Morgan Brand. 2006. "Determination of Ferulic Acid and Related Compounds by Thin Layer Chromatography." *African Journal of Biotechnology* 5 (13).
- Macheix, Jean-Jacques, Annie Fleuriet, Christian Jay-Allemand. 2005. *Les Composés Phénoliques Des Végétaux: Un Exemple de Métabolites Secondaires D'importance Économique*. PPUR Presses polytechniques.
- Magro, Christian. 1995. "Valorisation Des Pailles de Blé Par Fractionnement Thermo-Mécano-Chimique Dans Un Réacteur Bivis." Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Maillard, M-N, M-H Soum, P Boivin, C Berset. 1996. "Antioxidant Activity of Barley and Malt: Relationship with Phenolic Content." *LWT-Food Science and Technology* 29 (3): 238–44.
- Manach, Claudine, Augustin Scalbert, Christine Morand, Christian Rémésy, Liliana Jiménez. 2004. "Polyphenols: Food Sources and Bioavailability." *The American Journal of Clinical Nutrition* 79 (5): 727–47.
- Manolas, C, A Gaset, JP Jamet, L Rigal, S N'Diaye. 1995. "Process for Depithing Pith Containing Plants, in Particular Sorghum."
- Manolas, Christos. 1993. "Fractionnement Du Sorgho À Fibre. Extraction et Caractérisation Des Hémicelluloses de La Moelle. Etude Des Matériaux Composites." Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Marechal, Philippe. 2001. "Analyse Des Principaux Facteurs Impliqués Dans Le Fractionnement Combiné de Pailles et de Sons de Blé En Extrudeur Bi-Vis: Obtention D'agro-Matériaux." Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Maréchal, Virginie Vandenbossche. 1998. "Fractionnement Des Tiges et Capitules de Tournesol: Hydrodistillation D'une Huile Essentielle Odorante, Extraction et Modification Chimique de Pectines, et Mise En Forme D'agromatériaux Biodégradables." Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Marechal, V, L Rigal. 1999. "Characterization of by-Products of Sunflower Culture—commercial Applications for Stalks and Heads." *Industrial Crops and Products* 10 (3): 185–200.
- Markessini, Efthalia Vergopoulou, Pavlos Mouratidis, Edmone Roffael, Luc Rigal. 1997. "Method for Production of Lignocellulosic Composite Materials."
- Mateen, Faryal, Iqra Javed, Uzaira Rafique, Noshabah Tabassum, Maliha Sarfraz, Sher Zaman Safi, Ismail Yusoff, Muhammad Aqeel Ashraf. 2015. "New Method for the Adsorption of Organic Pollutants Using Natural Zeolite Incinerator Ash (ZIA) and Its Application as an

- Environmentally Friendly and Cost-Effective Adsorbent.” *Desalination and Water Treatment*, no. ahead-of-print: 1–9.
- Matthäus, Bertrand, Ludger Brühl. 2008. “Virgin Hemp Seed Oil: An Interesting Niche Product.” *European Journal of Lipid Science and Technology* 110 (7): 655–61.
- Méchin, Valérie, Odile Argillier, Véronique Menanteau, Yves Barrière, Isabelle Mila, Brigitte Pollet, Catherine Lapiere. 2000. “Relationship of Cell Wall Composition to in Vitro Cell Wall Digestibility of Maize Inbred Line Stems.” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80 (5): 574–80.
- Mediavilla, Vito, Simon Steinemann. 1997. “Essential Oil of *Cannabis sativa* L. Strains.” *J. Int. Hemp Assoc* 4: 80–82.
- Micard, V, J-F Thibault. 1999. “Oxidative Gelation of Sugar-Beet Pectins: Use of Laccases and Hydration Properties of the Cross-Linked Pectins.” *Carbohydrate Polymers* 39 (3): 265–73.
- Milutinović, Milica, Neda Radovanović, Mirjana Rajilić-Stojanović, Slavica Šiler-Marinković, Snežana Dimitrijević, Suzana Dimitrijević-Branković. 2014. “Microwave-Assisted Extraction for the Recovery of Antioxidants from Waste Equisetum Arvense.” *Industrial Crops and Products* 61: 388–97.
- Monteil-Rivera, Fanny, Guang Hai Huang, Louise Paquet, Stéphane Deschamps, Chantale Beaulieu, Jalal Hawari. 2012. “Microwave-Assisted Extraction of Lignin from Triticale Straw: Optimization and Microwave Effects.” *Bioresource Technology* 104: 775–82.
- Moore, Graham. 1996. *Nonwood Fibre Applications in Papermaking: A Literature Review*. Pira International.
- Mori, Hideki, K Kawabata, N Yoshimi, T Tanaka, T Murakami, T Okada, H Murai. 1998. “Chemopreventive Effects of Ferulic Acid on Oral and Rice Germ on Large Bowel Carcinogenesis.” *Anticancer Research* 19 (5A): 3775–78.
- Morrison, W Herbert, Danny E Akin, David S Himmelsbach, Gary R Gamble. 1993. “Investigation of the Ester-and Ether-linked Phenolic Constituents of Cell Wall Types of Normal and Brown Midrib Pearl Millet Using Chemical Isolation, Microspectrophotometry and ¹³C NMR Spectroscopy.” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 63 (3): 329–37.
- Motilva, Maria-José, Aida Serra, Alba Macià. 2013. “Analysis of Food Polyphenols by Ultra High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry: An Overview.” *Journal of Chromatography A* 1292: 66–82.
- Moxley, Geoffrey, Zhiguang Zhu, Y-H Percival Zhang. 2008. “Efficient Sugar Release by the Cellulose Solvent-Based Lignocellulose Fractionation Technology and Enzymatic Cellulose Hydrolysis.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (17): 7885–90.
- Mwaikambo, L. 2006. “Review of the History, Properties and Application of Plant Fibres.” *African Journal of Science and Technology* 7 (2): 121.
- Naczki, Marian, Fereidoon Shahidi. 2004. “Extraction and Analysis of Phenolics in Food.” *Journal of Chromatography A* 1054 (1): 95–111.
- N’Diaye, S. 1996. “Fractionnement de La Matière Végétale : Mise Au Point D’un Procédé Thermo-Mécanochimique et Modélisation Du Fonctionnement Du Réacteur Bi-Vis.” Thèse, INP Toulouse.
- N’Diaye, S, L Rigal. 2000. “Factors Influencing the Alkaline Extraction of Poplar Hemicelluloses in a Twin-Screw Reactor: Correlation with Specific Mechanical Energy

- and Residence Time Distribution of the Liquid Phase.” *Bioresource Technology* 75 (1): 13–18.
- N’Diaye, S, L Rigal, P Larocque, PF Vidal. 1996. “Extraction of Hemicelluloses from Poplar, *Populus Tremuloides*, Using an Extruder-Type Twin-Screw Reactor: A Feasibility Study.” *Bioresource Technology* 57 (1): 61–67.
- Nguyen, Tai Thu. 2010. “Contribution À L’étude de La Formulation et Du Procédé de Fabrication D’éléments de Construction En Béton de Chanvre.” Thèse, Université de Bretagne Sud.
- Niwa, Yukie, Yoshiki Miyachi. 1986. “Antioxidant Action of Natural Health Products and Chinese Herbs.” *Inflammation* 10 (1): 79–91.
- nova-Institut GmbH. 2014. “Worldwide Growth in Industrial Hemp – Fibres, Shivs, Seed & Oil and Pharmaceuticals.” In 11th International Conference of the European Industrial Hemp Association (EIHA).
- Oomah, B Dave, Muriel Busson, David V Godfrey, John CG Drover. 2002. “Characteristics of Hemp (*Cannabis sativa* L.) Seed Oil.” *Food Chemistry* 76 (1): 33–43.
- Oosterveld, A, IE Pol, G Beldman, AGJ Voragen. 2001. “Isolation of Feruloylated Arabinans and Rhamnogalacturonans from Sugar Beet Pulp and Their Gel Forming Ability by Oxidative Cross-Linking.” *Carbohydrate Polymers* 44 (1): 9–17.
- Orhan, I, S Kusmenoglu, B Sener. 2000. “GC-MS Analysis of the Seed Oil of *Cannabis sativa* L. Cultivated in Turkey.” *ECZACILIK FAKULTESI DERGISI-GAZI UNIVERSITESI* 17 (2): 79–82.
- Ou, Shiyi, Kin-Chor Kwok. 2004. “Ferulic Acid: Pharmaceutical Functions, Preparation and Applications in Foods.” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84 (11): 1261–69.
- Ou, Shiyi, Yanlin Luo, Feng Xue, Caihuan Huang, Ning Zhang, Zili Liu. 2007. “Seperation and Purification of Ferulic Acid in Alkaline-Hydrolysate from Sugarcane Bagasse by Activated Charcoal Adsorption/anion Macroporous Resin Exchange Chromatography.” *Journal of Food Engineering* 78 (4): 1298–1304.
- Ou, S, Y Li, K Gao. 1999. “A Study on Scavenging Activity of Wheat Bran Dietary Fiber for Free Radical.” *Acta Nutr Sin* 21: 191–94.
- Owen, RW, R Haubner, WE Hull, G Erben, B Spiegelhalder, H Bartsch, B Haber. 2003. “Isolation and Structure Elucidation of the Major Individual Polyphenols in Carob Fibre.” *Food and Chemical Toxicology* 41 (12): 1727–38.
- Pandey, SN. 2007. “Ramie Fibre: Part I. Chemical Composition and Chemical Properties. A Critical Review of Recent Developments.” *Textile Progress* 39 (1): 1–66.
- Pan, George X, Jennifer L Bolton, Gordon J Leary. 1998. “Determination of Ferulic and P-Coumaric Acids in Wheat Straw and the Amounts Released by Mild Acid and Alkaline Peroxide Treatment.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (12): 5283–88.
- Pan, Xuejun, Guoguang Niu, Huizhou Liu. 2003. “Microwave-Assisted Extraction of Tea Polyphenols and Tea Caffeine from Green Tea Leaves.” *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 42 (2): 129–33.
- Papadopoulou, E, D Bikiaris, K Chrysafis, M Wladyka-Przybylak, D Wesolek, J Mankowski, J Kolodziej, P Baraniecki, K Bujnowicz, V Gronberg. 2014. “Value-Added Industrial Products from Bast Fiber Crops.” *Industrial Crops and Products*.
- Pérez-Magariño, Silvia, Miriam Ortega-Heras, Estela Cano-Mozo. 2008. “Optimization of a Solid-Phase Extraction Method Using Copolymer Sorbents for Isolation of Phenolic

- Compounds in Red Wines and Quantification by HPLC.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (24): 11560–70.
- Périno-Issartier, Sandrine, Maryline Abert-Vian, Farid Chemat. 2011. “Solvent Free Microwave-Assisted Extraction of Antioxidants from Sea Buckthorn (*Hippophae Rhamnoides*) Food by-Products.” *Food and Bioprocess Technology* 4 (6): 1020–28.
- Peyrat, Eric. 2000. “Nouveau Composite Biodégradable Obtenu À Partir de Maïs Plante Entière: Étude Du Procédé de Transformation Thermo-Mécano-Chimique En Extrudeur Bi-Vis et de La Mise En Forme Par Injection-Moulage.”
- Pierce, Deborah, Geoffrey Brooks. 2000. “Cosmetic; Quaternized Fatty Acid,” May.
- Pojić, Milica, Aleksandra Mišan, Marijana Sakač, Tamara Dapčević Hadnađev, Bojana Šarić, Ivan Milovanović, Miroslav Hadnađev. 2014. “Characterization of By-Products Originating From Hemp Oil Processing.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Popa, Marcel Ionel, Silvia Pernevan, Cecilia Sirghie, Iuliana Spiridon, Dorina Chambre, Dana Maria Copolovici, Niculina Popa. 2013. “Mechanical Properties and Weathering Behavior of Polypropylene-Hemp Shives Composites.” *Journal of Chemistry* 2013.
- Prat, Laurent. 1998. “Modélisation d'un réacteur thermo-mécano-chimique bi-vis utilise en fractionnement de matière végétale.” Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Primo, Ana, Hermenegildo Garcia. 2014. “Zeolites as Catalysts in Oil Refining.” *Chemical Society Reviews* 43 (22): 7548–61.
- Proestos, Charalampos, Michael Komaitis. 2008. “Application of Microwave-Assisted Extraction to the Fast Extraction of Plant Phenolic Compounds.” *LWT-Food Science and Technology* 41 (4): 652–59.
- Qiu, Yang, Qin Liu, Trust Beta. 2010. “Antioxidant Properties of Commercial Wild Rice and Analysis of Soluble and Insoluble Phenolic Acids.” *Food Chemistry* 121 (1): 140–47.
- Quan, Can, Yongyue Sun, Jia Qu. 2009. “Ultrasonic Extraction of Ferulic Acid from *Angelica Sinensis*.” *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 87 (4): 562–67.
- Ragee, Sanaa, Seetharaman, Koushik, et Abdel-Aal, El-Sayed M. 2014. The impact of milling and thermal processing on phenolic compounds in cereal grains. *Critical reviews in food science and nutrition*, vol. 54, no 7, p. 837-849.
- Ram, MS, Floyd E Dowell, Larry M Seitz. 2003. “FT-Raman Spectra of Unsoaked and NaOH-Soaked Wheat Kernels, Bran, and Ferulic Acid.” *Cereal Chemistry* 80 (2): 188–92.
- Reddy, Narendra, Yiqi Yang. 2007. “Natural Cellulose Fibers from Switchgrass with Tensile Properties Similar to Cotton and Linen.” *Biotechnology and Bioengineering* 97 (5): 1021–27.
- Rigal, Matthieu. 2015. “Éco-Conception de Matériaux Pour La Construction À Partir de La Valorisation de La Biomasse Présente Sur Le Territoire de CCCE: Etude Des Propriétés Chimiques et Physico-Chimiques de Matrices Fibreuses et de Fractions Extractibles, Pour Leur Mise En Œuvre En Vue de L'obtention D'agromatériaux Pour Le Secteur Des Éco Industries.” Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Rigutto, Marcello S, Rob van Veen, Laurent Huve. 2007. “Zeolites in Hydrocarbon Processing.” *Studies in Surface Science and Catalysis* 168: 855 – XXVI.
- Roginsky, Vitaly et Lissi, Eduardo A. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food chemistry*, vol. 92, no 2, p. 235-254.
- Rosazza, JPN. 1995. “Biocatalysis microbiology, and chemistry - The power of positive linking.” *Asm News* 61 (5): 241–45.

- Ross, Kelly, Giuseppe Mazza. 2010. "Characteristics of Lignin from Flax Shives as Affected by Extraction Conditions." *International Journal of Molecular Sciences* 11 (10): 4035–50.
- Rostagno, Mauricio A, Miguel Palma, Carmelo G Barroso. 2003. "Ultrasound-Assisted Extraction of Soy Isoflavones." *Journal of Chromatography A* 1012 (2): 119–28.
- Rostagno, Mauricio A, Juliana M Prado. 2013. *Natural Product Extraction: Principles and Applications*. Royal Society of Chemistry.
- Rouilly, Antoine. 2002. "Nouveaux Agro-Matériaux Composites À Matrice Protéique Ou Polysaccharidique: Étude Du Fractionnement, de La Transformation et de La Mise En Forme Par Extrusion et Par Injection-Moulage de La Pulpe de Betterave et Du Tourteau de Tournesol." Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Saija, Antonella, Antonio Tomaino, Domenico Trombetta, Anna De Pasquale, Nicola Uccella, Tony Barbuzzi, Donatella Paolino, Francesco Bonina. 2000. "In Vitro and in Vivo Evaluation of Caffeic and Ferulic Acids as Topical Photoprotective Agents." *International Journal of Pharmaceutics* 199 (1): 39–47.
- Saikia, CN, T Goswami, F Ali. 1997. "Evaluation of Pulp and Paper Making Characteristics of Certain Fast Growing Plants." *Wood Science and Technology* 31 (6): 467–75.
- Sajewicz, Mieczyslaw, Dorota Staszek, Monika Waksmundzka-Hajnos, Teresa Kowalska. 2012. "Comparison of TLC and HPLC Fingerprints of Phenolic Acids and Flavonoids Fractions Derived from Selected Sage (*Salvia*) Species." *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 35 (10): 1388–1403.
- Salgado, José Manuel, Belén Max, Raquel Rodríguez-Solana, José M Domínguez. 2012. "Purification of Ferulic Acid Solubilized from Agroindustrial Wastes and Further Conversion into 4-Vinyl Guaiacol by *Streptomyces Setonii* Using Solid State Fermentation." *Industrial Crops and Products* 39: 52–61.
- Saltas, Dimitrios, Christos S Pappas, Dimitra Daferera, Petros A Tarantilis, Moschos G Polissiou. 2013. "Direct Determination of Rosmarinic Acid in Lamiaceae Herbs Using Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy (DRIFTS) and Chemometrics." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (13): 3235–41.
- Sanchez, Philippe. 1990. "Procédé de Production de Sirop de Xylose Par Hydrolyse Acide de Sorgho." Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Sánchez-Maldonado, A. F., A. Schieber, et M. G. Gänzle. 2011. "Structure–function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria." *Journal of applied microbiology* 111(5) : 1176-1184.
- Saulnier, Luc, Marie-Jeanne Crépeau, Marc Lahaye, Jean-François Thibault, Maria T Garcia-Conesa, Paul A Kroon, Gary Williamson. 1999. "Isolation and Structural Determination of Two 5, 5'-Diferuloyl Oligosaccharides Indicate That Maize Heteroxylans Are Covalently Cross-Linked by Oxidatively Coupled Ferulates." *Carbohydrate Research* 320 (1): 82–92.
- Savoire, Raphaëlle, Jean-Louis Lanoisellé, Eugène Vorobiev. 2013. "Mechanical Continuous Oil Expression from Oilseeds: A Review." *Food and Bioprocess Technology* 6 (1): 1–16.
- Saw, Sudhir Kumar, Gautam Sarkhel, Arup Choudhury. 2012. "Preparation and Characterization of Chemically Modified Jute–Coir Hybrid Fiber Reinforced Epoxy Novolac Composites." *Journal of Applied Polymer Science* 125 (4): 3038–49.
- Schulz, Hartwig, Malgorzata Baranska. 2007. "Identification and Quantification of Valuable Plant Substances by IR and Raman Spectroscopy." *Vibrational Spectroscopy* 43 (1): 13–25.

- Shea, Andy, Mike Lawrence, Pete Walker. 2012. "Hygrothermal Performance of an Experimental Hemp–lime Building." *Construction and Building Materials* 36: 270–75.
- Shu, Huai-Te, Danyun Li, Alfred A Scala, Yi Hua Ma. 1997. "Adsorption of Small Organic Pollutants from Aqueous Streams by Aluminosilicate-Based Microporous Materials." *Separation and Purification Technology* 11 (1): 27–36.
- Silvestre, F, L Rigal, J Leyris, A Gaset. 1999. "Colle À L'eau À Base D'extrait Protéique Végétal et Procédé de Préparation." *Brevet Européen EP*.
- Sosulski, Frank, Krzysztof Krygier, Lawrence Hogge. 1982. "Free, Esterified, and Insoluble-Bound Phenolic Acids. 3. Composition of Phenolic Acids in Cereal and Potato Flours." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 30 (2): 337–40.
- Soto, María Luisa, Andrés Moure, Herminia Domínguez, Juan Carlos Parajó. 2011. "Recovery, Concentration and Purification of Phenolic Compounds by Adsorption: A Review." *Journal of Food Engineering* 105 (1): 1–27.
- Stalikas, Constantine D. 2007. "Extraction, Separation, and Detection Methods for Phenolic Acids and Flavonoids." *Journal of Separation Science* 30 (18): 3268–95.
- Stashenko, Elena E, Beatriz E Jaramillo, Jairo René Martínez. 2004a. "Analysis of Volatile Secondary Metabolites from Colombian *Xylopia Aromatica* (Lamarck) by Different Extraction and Headspace Methods and Gas Chromatography." *Journal of Chromatography A* 1025 (1): 105–13.
- Stashenko, Elena E, Beatriz E Jaramillo, Jairo René Martínez. 2004b. "Comparison of Different Extraction Methods for the Analysis of Volatile Secondary Metabolites of *Lippia Alba* (Mill.) NE Brown, Grown in Colombia, and Evaluation of Its in Vitro Antioxidant Activity." *Journal of Chromatography A* 1025 (1): 93–103.
- Staudt, R, M Thommes. 2008. "Zeolites and Adsorption: Model Materials and Applications." *Zeolites: From Model Materials to Industrial Catalysts*, Ed. J. Cejka, J. Perez-Pariente and WJ Roth, Transworld Research Network, 207–25.
- Sterbova, Dagmar, David Matějček, Jiří Vlček, Vlastimil Kubáň. 2004. "Combined Microwave-Assisted Isolation and Solid-Phase Purification Procedures prior to the Chromatographic Determination of Phenolic Compounds in Plant Materials." *Analytica Chimica Acta* 513 (2): 435–44.
- Stevanovic, Tatjana, Dominique Perrin. 2009. *Chimie Du Bois*. Presses polytechniques et universitaires romandes.
- Stevulova, N, L Kidalova, J Junak, J Cigasova, E Terpakova. 2012. "Effect of Hemp Shive Sizes on Mechanical Properties of Lightweight Fibrous Composites." *Procedia Engineering* 42: 496–500.
- Struik, P.C., S. Amaducci, M.J. Bullard, N.C. Stutterheim, G. Venturi, H.T.H. Cromack. 2000. "Agronomy of Fibre Hemp (*Cannabis sativa* L.) in Europe." *Industrial Crops and Products* 11 (2–3): 107–18. doi:10.1016/S0926-6690(99)00048-5.
- Sun, Yongyue, Shufen Li, Huiting Song, Songjiang Tian. 2006. "Extraction of Ferulic Acid from *Angelica Sinensis* with Supercritical CO₂." *Natural Product Research* 20 (9): 835–41.
- Synytsya, A, Jana Copikova, Petra Jankovská, P Matejka, V Machovic. 2003a. "Spectroscopic Estimation of Feruloyl Groups in Sugar Beet Pulp and Pectin." *International Sugar Journal* 105 (1258): 481–88.
- Synytsya, A, J Čopíková, P Matějka, V Machovič. 2003b. "Fourier Transform Raman and Infrared Spectroscopy of Pectins." *Carbohydrate Polymers* 54 (1): 97–106.

- Taj, Saira, Munawar Ali Munawar, Shafiullah Khan. 2007. "Natural Fiber-Reinforced Polymer Composites." *Proceedings-Pakistan Academy of Sciences* 44 (2): 129.
- Tang, Chuan-He, Zi Ten, Xian-Sheng Wang, Xiao-Quan Yang. 2006. "Physicochemical and Functional Properties of Hemp (*Cannabis sativa* L.) Protein Isolate." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (23): 8945–50.
- Tang, Pei-Ling, Osman Hassan, Jamaliah Md-Jahim, Wan Aida Wan Mustapha, Mohamad Yusof Maskat. 2014. "Fibrous Agricultural Biomass as a Potential Source for Bioconversion to Vanillic Acid." *International Journal of Polymer Science* 2014.
- Tapin, Sandra, Jean-Claude Sigoillot, Marcel Asther, Michel Petit-Conil. 2006. "Feruloyl Esterase Utilization for Simultaneous Processing of Nonwood Plants into Phenolic Compounds and Pulp Fibers." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (10): 3697–3703.
- Terres Inovia. 2015. "Http://www.terresinovia.fr/. Dernière Consultation En Juin 2015."
- Thiel, Alexander, Nils Tippkötter, Kirstin Suck, Ulrich Soehling, Friedrich Ruf, Roland Ulber. 2013. "New Zeolite Adsorbents for Downstream Processing of Polyphenols from Renewable Resources." *Engineering in Life Sciences* 13 (3): 239–46.
- Thi, Nguyen Duong Thanh, Tran Huu Anh, Le Ngoc Thach. 2008. "The Essential Oil Composition of *Eryngium Foetidum* L. in South Vietnam Extracted by Hydrodistillation under Conventional Heating and Microwave Irradiation." *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 11 (2): 154–61.
- Tian, Su, Kozo Nakamura, Tong Cui, Hiroshi Kayahara. 2005. "High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Phenolic Compounds in Rice." *Journal of Chromatography A* 1063 (1): 121–28.
- Tilay, Ashwini, Mahesh Bule, Jyoti Kishenkumar, Uday Annapure. 2008. "Preparation of Ferulic Acid from Agricultural Wastes: Its Improved Extraction and Purification." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (17): 7644–48.
- Toonen, Marcel AJ, Chris Maliepaard, Theo H Reijmers, Hilko van der Voet, H Dick Mastebroek, Hetty C van den Broeck, Michel JM Ebskamp, Waltraud Kessler, Rudolf W Kessler. 2004. "Predicting the Chemical Composition of Fibre and Core Fraction of Hemp (*Cannabis sativa* L.)." *Euphytica* 140 (1-2): 39–45.
- Tsubaki, S, Y Ozaki, J Azuma. 2010. "Microwave-Assisted Autohydrolysis of *Prunus Mume* Stone for Extraction of Polysaccharides and Phenolic Compounds." *Journal of Food Science* 75 (2): C152–59.
- Tsubaki, S, Masahiro Sakamoto, Jun-ichi Azuma. 2010. "Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Tea Residues under Autohydrolytic Conditions." *Food Chemistry* 123 (4): 1255–58.
- Turner, Carlton E, Mahmoud A Elsohly, Edward G Boeren. 1980. "Constituents of *Cannabis sativa* L. XVII. A Review of the Natural Constituents." *Journal of Natural Products* 43 (2): 169–234.
- Vandenbossche, Virginie, Catherine Doumeng, Luc Rigal. 2014. "Thermomechanical and Thermo-Mechano-Chemical Pretreatment of Wheat Straw Using a Twin-Screw Extruder." *BioResources* 9 (1): 1519–38.
- Versari, Andrea, Giuseppina Paola Parpinello, Francesca Scazzina, Daniele Del Rio. 2010. "Prediction of Total Antioxidant Capacity of Red Wine by Fourier Transform Infrared Spectroscopy." *Food Control* 21 (5): 786–89.

- Ververis, C, K Georghiou, N Christodoulakis, P Santas, R Santas. 2004. "Fiber Dimensions, Lignin and Cellulose Content of Various Plant Materials and Their Suitability for Paper Production." *Industrial Crops and Products* 19 (3): 245–54.
- Vignon, M.R., C. Garcia-Jaldon, D. Dupeyre. 1995. "Steam Explosion of Woody Hemp Chênevotte." *International Journal of Biological Macromolecules* 17 (6): 395–404.
- Vlase, Laurian, Benedec, Daniela, Hanganu, Daniela, Damian, Grigore, Csillag, Ioan, Sevastre, Bogdan, Mot C., Augustin, Silaghi-Dumitrescu, Radu et Tilea, Ioan. 2014. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities and phenolic profile for Hyssopus officinalis, Ocimum basilicum and Teucrium chamaedrys. *Molecules*, vol. 19(5), p. 5490-5507.
- Wang, Lijun, Curtis L Weller. 2006. "Recent Advances in Extraction of Nutraceuticals from Plants." *Trends in Food Science & Technology* 17 (6): 300–312.
- Wang, Rui, Hong-Jian Yang, Xin Yang, Bing-Hai Cao. 2013. "Four Phenolic Acids Determined by an Improved HPLC Method with a Programmed Ultraviolet Wavelength Detection and Their Relationships with Lignin Content in 13 Agricultural Residue Feeds." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93 (1): 53–60.
- Wanyo, Pitchaporn, Naret Meeso, Sirithon Siriamornpun. 2014. "Effects of Different Treatments on the Antioxidant Properties and Phenolic Compounds of Rice Bran and Rice Husk." *Food Chemistry* 157: 457–63.
- Webber, Charles L, Julia Whitworth, John Dole. 1999. "Kenaf (*Hibiscus Cannabinus* L.) Core as a Containerized Growth Medium Component." *Industrial Crops and Products* 10 (2): 97–105.
- Widayatno, Wahyu Bambang, Guoqing Guan, Jenny Rizkiana, Xiao Du, Xiaogang Hao, Zhonglin Zhang, Abuliti Abudula. 2015. "Selective Catalytic Conversion of Bio-Oil over High-Silica Zeolites." *Bioresource Technology* 179: 518–23.
- Williams, George I, Richard P Wool. 2000. "Composites from Natural Fibers and Soy Oil Resins." *Applied Composite Materials* 7 (5-6): 421–32.
- Wilson, Thomas A, Robert J Nicolosi, Benjamin Woolfrey, David Kritchevsky. 2007. "Rice Bran Oil and Oryzanol Reduce Plasma Lipid and Lipoprotein Cholesterol Concentrations and Aortic Cholesterol Ester Accumulation to a Greater Extent than Ferulic Acid in Hypercholesterolemic Hamsters." *The Journal of Nutritional Biochemistry* 18 (2): 105–12.
- "www.chanvre.oxatis.com. Dernière Consultation En Avril 2015."
- Xie, Jie, Wenna Meng, Deyi Wu, Zhenjia Zhang, Hainan Kong. 2012. "Removal of Organic Pollutants by Surfactant Modified Zeolite: Comparison between Ionizable Phenolic Compounds and Non-Ionizable Organic Compounds." *Journal of Hazardous Materials* 231: 57–63.
- Xu, Feng, Run-Cang Sun, Jin-Xia Sun, Chuan-Fu Liu, Bei-Hai He, Jin-Shan Fan. 2005. "Determination of Cell Wall Ferulic and P-Coumaric Acids in Sugarcane Bagasse." *Analytica Chimica Acta* 552 (1–2): 207–17.
- Yao, Fei, Qinglin Wu, Yong Lei, Weihong Guo, Yanjun Xu. 2008. "Thermal Decomposition Kinetics of Natural Fibers: Activation Energy with Dynamic Thermogravimetric Analysis." *Polymer Degradation and Stability* 93 (1): 90–98.
- Yapo, Beda Marcel, Bernard Wathelet, Michel Paquot. 2007. "Comparison of Alcohol Precipitation and Membrane Filtration Effects on Sugar Beet Pulp Pectin Chemical Features and Surface Properties." *Food Hydrocolloids* 21 (2): 245–55.

- Yemiş, Oktay, Giuseppe Mazza. 2011. "Acid-Catalyzed Conversion of Xylose, Xylan and Straw into Furfural by Microwave-Assisted Reaction." *Bioresource Technology* 102 (15): 7371–78.
- Yonli, Arsène H, Mohamed Khalid, Isabelle Batonneau-Gener, Jean Koulidiati, Guy Joly, Patrick Magnoux, Samuel Mignard. 2011. "Removal of Phenolic Pollutants from Water over BEA and HY Zeolites in Batch Conditions." *Journal of Chemistry and Chemical Engineering* 5 (5): 429–34.
- Zakzeski, Joseph, Pieter CA Bruijninx, Anna L Jongerius, Bert M Weckhuysen. 2010. "The Catalytic Valorization of Lignin for the Production of Renewable Chemicals." *Chemical Reviews* 110 (6): 3552–99.
- Zeitoun, Rawan. 2011. "Procédés de Fractionnement de La Matière Végétale: Application À La Production Des Polysaccharides Du Son et de La Paille de Blé." Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Zeng, Yining, Shuai Zhao, Shihui Yang, Shi-You Ding. 2014. "Lignin Plays a Negative Role in the Biochemical Process for Producing Lignocellulosic Biofuels." *Current Opinion in Biotechnology* 27: 38–45.
- Zhang, Caiya, Yun Shen, Jian Chen, Peng Xiao, Jinsong Bao. 2008. "Nondestructive Prediction of Total Phenolics, Flavonoid Contents, and Antioxidant Capacity of Rice Grain Using near-Infrared Spectroscopy." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (18): 8268–72.
- Zhang, Zhi Qing, Yan Yan Yao, Li Ming Zhou, Shan Bo Xiong, Jian Jun Xiang. 2012. "Release of Ferulic Acid from Wheat Bran by Ultrasonic Assisted Alkaline Hydrolysis." *Advanced Materials Research* 361: 712–23.
- Zhao, Shengqiang, Shengwen Yao, Shiyi Ou, Jing Lin, Yong Wang, Xichun Peng, Aijun Li, Bing Yu. 2014. "Preparation of Ferulic Acid from Corn Bran: Its Improved Extraction and Purification by Membrane Separation." *Food and Bioproducts Processing* 92 (3): 309–13.
- Zheng, Dan. 2011. "Modification Des Propriétés de Surface de Matériaux Lignifiés: Impact D'un Greffage Par Voie Physique." Thèse, Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, AgroParisTech.

Chapitre II

Caractérisation de deux coproduits de la filière chanvre et détermination de leur potentiel en acides hydroxycinnamiques

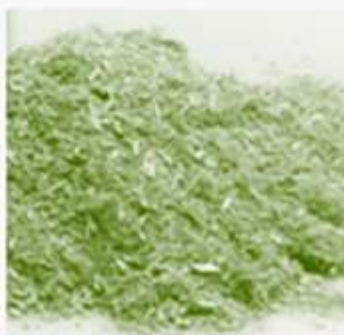
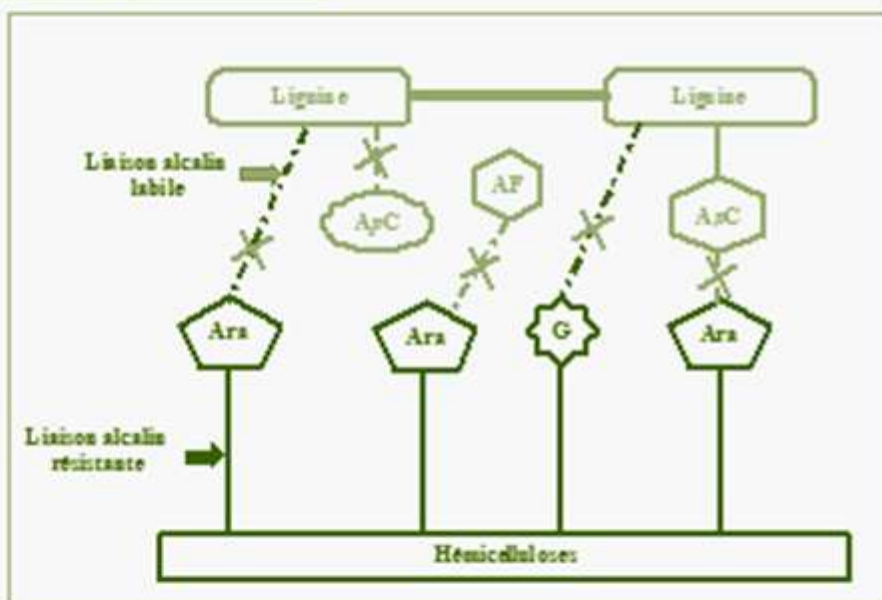
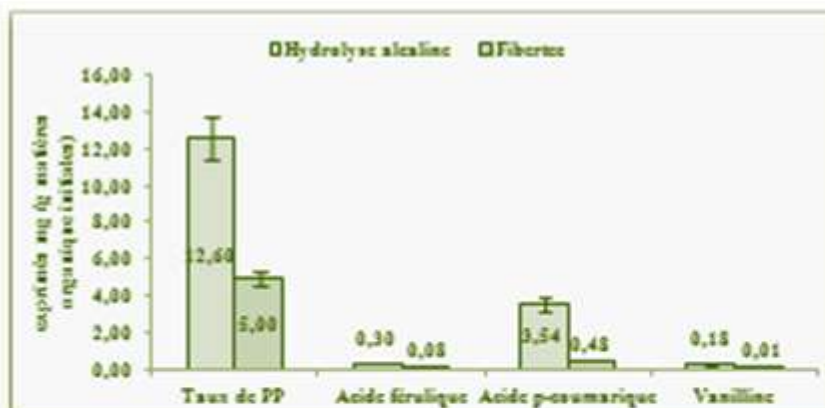


Table des matières

II.1. Répartition des principaux constituants des coproduits.....	107
II.1.1. La chènevotte ou copeaux de chanvre	107
II.1.1.1. Caractéristiques générales : origine et description.....	107
II.1.1.2. Caractérisations physique et microscopique	108
II.1.1.2.1. Caractérisation physique	108
II.1.1.2.2. Caractérisation des parois végétales par des approches en microscopie	110
a. Mise en évidence des structures tissulaires.....	111
b. Mise en évidence des composés lignifiés	111
c. Mise en évidence des composés aromatiques par autofluorescence.....	112
II.1.1.3. Analyse quantitative des constituants de la chènevotte	117
a. Composition de la matière minérale	117
b. Cellulose, Hémicelluloses, lignines	118
c. Les composants minoritaires.....	121
II.1.1.4. Extraction et analyse de la fraction phénolique	122
II.1.2. La poudre organique	127
II.1.2.1. Caractéristiques générales : origine et description.....	127
II.1.2.2. Caractérisation physique, observation microscopique, évaluation des facteurs de formes	128
II.1.2.3. Analyse quantitative des constituants de la poudre organique	131
a. Composition de la matière minérale	131
b. Cellulose, hémicelluloses, lignines	131
c. Les composants minoritaires.....	132
II.1.2.4. Extraction et analyse de la fraction phénolique	133
II.2. Extraction des acides hydroxycinnamiques des coproduits du chanvre	136
II.2.1. La chènevotte	138
II.2.1.1. Extraction analytique sans hydrolyse chimique.....	138
II.2.1.2. Hydrolyse alcaline en batch	142
II.2.2. La poudre organique	145
II.2.2.1. Extractions analytiques sans hydrolyse chimique.....	145

II.2.2.2. Hydrolyse alcaline.....	148
II.3. Caractérisation des liaisons éther/ester dans les coproduits lignocellulosiques du chanvre	151
II.3.1. Présentation de la technique d'extraction séquencée.....	154
II.3.2. Application à la chènevotte.....	158
II.3.3. Application à la poudre organique	163
II.3.4. Conclusions sur l'extraction séquencée	167
II.4. Conclusion	168
II.5. Références bibliographiques	171

Une meilleure connaissance des caractéristiques physico-chimiques des deux coproduits du chanvre utilisés dans ce projet est une étape nécessaire pour la recherche de nouvelles voies de valorisations chimiques de ces matières premières. Dans ce chapitre, les caractéristiques physiques et la composition chimique plus particulièrement en acides hydroxycinnamiques de chacun des coproduits ont été étudiées dans différentes conditions opératoires.

Dans un deuxième temps, les résultats du fractionnement des coproduits par différents procédés d'extraction tels que la macération, le Soxhlet et l'extraction ASE ont été comparés. L'effet des paramètres opératoires (température, nature du solvant, durée, rapport liquide/solide, ...) sur l'extraction des composés phénoliques libres est évalué.

L'hydrolyse en milieu alcalin des deux coproduits du chanvre a été plus particulièrement étudiée. Elle devrait permettre d'extraire en plus des composés phénoliques libres, les composés phénoliques liés à la structure lignocellulosique.

Enfin, les proportions des différents types de liaisons (éther, ester) entre les acides phénoliques et la structure lignocellulosique des deux coproduits ont été estimées par une extraction analytique séquencée.

II.1. Répartition des principaux constituants des coproduits

Pour cette étude, les coproduits de chanvre ont été fournis par une usine de défibrage « AGROFIBRE SAS », située dans le Sud-Ouest de la France, dédiée à la première transformation du chanvre industriel. Le processus mis en œuvre chez AGROFIBRE est exclusivement mécanique, et consiste en des étapes successives de broyages, tamisages, effilochages, calibrage et conditionnement des produits intermédiaires.

II.1.1. La chènevotte ou copeaux de chanvre

II.1.1.1. Caractéristiques générales : origine et description

La chènevotte se présente sous forme de lots de 20 kg de « granulats isolants en chanvre ». Les caractéristiques de ces granulats figurent dans les Tableaux II.1 et II.2.

Tableau II.1 : Caractéristiques techniques du lot de chènevotte (Agrofibre)

Longueur des granulats	5 à 30 mm
Epaisseur des granulats	1 à 3 mm
Densité (ρ)	90-115 kg/m ³
Conductivité thermique (λ)	0,05 W/m.K
Capacité d'absorption	10 L/kg

La chènevotte, de couleur jaune clair et de structure creuse, est caractérisée par sa grande capacité d'absorption (10 L/kg) et sa légèreté ($\rho = 90-115 \text{ kg/m}^3$) d'où son emploi comme litière à la fois pour les animaux domestiques (chats, lapins ...) et les chevaux.

Tableau II.2 : Teneurs en matière sèche et en matière minérale de la chènevotte

Taux de matière sèche	NF V 03-903	91,66 \pm 0,03 %
Taux de matière minérale	NF V 03-322	2,77 \pm 0,07 %

Le lot de chènevotte présente une faible teneur en eau, de l'ordre des valeurs citées dans la littérature (Bouloc 2006). Sa teneur en matière minérale est faible, comparable à celles exposées dans la littérature et comprise entre 1 et 5 %/MS (Vignon, Garcia-Jaldon, et Dupeyre 1995 ; Correia, Roy, et Goel 2001 ; Bouloc 2006 ; Gandolfi *et al.* 2013).

II.1.1.2. Caractérisations physique et microscopique

II.1.1.2.1. Caractérisation physique

La morphologie externe de la chènevotte, observée sous loupe binoculaire, montre une hétérogénéité au niveau de la taille des particules (Figures II.1 et II.2). Cette hétérogénéité a été confirmée par l'analyse de la forme mais aussi par la mesure de la taille des particules en utilisant le logiciel ImageJ (USA) (Tableau II.3).



Figure II.1 : Lot de chènevotte observé sous loupe binoculaire Z45 Nachet (France) (Barre d'échelle = 2 mm, grossissement = 4)



Figure II.2 : Particules de chènevotte observées sous loupe binoculaire Z45 Nachet (France) (Barre d'échelle = 2 mm, grossissement = 4)

Tableau II.3 : Caractéristiques morphologiques et volumétriques de la chènevotte

Nombre d'images⁽¹⁾	4
Nombre de particules⁽²⁾	18
Longueur (μm)	5324 ± 3154
Diamètre (μm)	1198 ± 859
Facteur de forme⁽³⁾	5,60 ± 3,28
Densité apparente avant compactage (kg/m³)⁽⁴⁾	103 ± 5
Densité tapée (kg/m³)⁽⁴⁾	150 ± 13

(1) : nombre de photos prises par la loupe binoculaire en utilisant le logiciel Archimed 4.0

(2) : nombre total de particules mesurées

(3) : longueur de la particule/diamètre

(4) : densités, duplicat, méthode de la densité tapée (250 coups/min, Densitap EDT-20 (France)), 5 séries de tassage

A partir du Tableau II.3, il est possible de conclure que les particules de chènevotte ont une longueur moyenne de 5,3 mm ± 3,2 et un diamètre moyen de 1,2 mm ± 0,9. Il existe donc une disparité importante.

La distribution granulométrique des particules de chènevotte a été étudiée par tamisage (Figure II.3). Elle est exprimée en pourcentage de masse totale et permet de classer les particules en

fonction de leur taille. La plus grande proportion de particules (54 %) correspond à un tamis de maille de 1,6 à 3,15 mm (Figure II.3). Cette analyse confirme l'hétérogénéité du lot et la présence de particules fines mélangées à une population de particules de taille moyenne supérieure à 2 mm.

Les faibles valeurs de densité apparente (103 kg/m^3) et tapée (150 kg/m^3) confirment les valeurs techniques données par Agrofibre ainsi que la légèreté de cette matière.

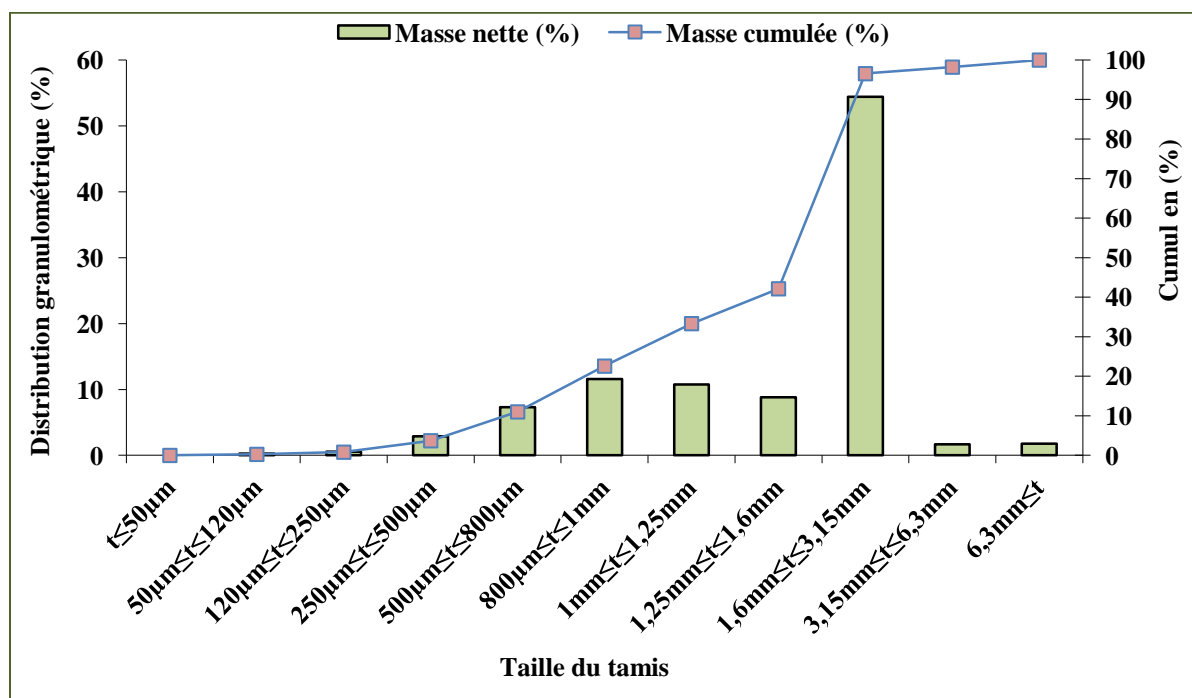


Figure II.3: Distribution granulométrique des particules du lot de chènevotte (tamiseuse à vibration AS 300 (Retsch, Allemagne))

Pour la suite des analyses, la matière végétale a été broyée à 0,5 mm au broyeur à couteaux Pulvérisette BRO 181 (Fritsch, Allemagne).

II.1.1.2.2. Caractérisation des parois végétales par des approches en microscopie

L'étude par microscopie a été réalisée en collaboration avec la plateforme d'imagerie végétale FRAIB-INRA (Auzeville) sous la direction de M. Alain Jauneau.

a. Mise en évidence des structures tissulaires

Les observations ont été faites sur des coupes de matériels en l'état. Les coupes montées dans l'eau entre lame et lamelle sont observées de façon extemporanée en lumière blanche. L'objectif est d'observer la structuration du matériel (type et organisation des tissus).

On peut observer que le matériel est composé essentiellement de bois (Figure II.4). Il reste des plages de parenchyme médullaire et un peu de parenchyme cortical avec quelques fibres. Les cellules au sein du bois restent jointives malgré la coupe et le montage dans l'eau.

b. Mise en évidence des composés lignifiés

Réaction de Wiesner (Coloration au Phloroglucinol-HCl) : La réaction de Wiesner a été réalisée sur des fragments de chènevotte ou sur des coupes transversales :

- Sur les fragments de chènevotte, la réaction est rapide et intense. Les observations ont été faites en lumière blanche en stéréomicroscopie avec des objectifs à longue distance de travail.
- Sur des coupes transversales de chènevotte (Figure II.5, A-B), la présence de lignine a été facilement mise en évidence dans l'ensemble des parois des vaisseaux, des fibres et des rayons au sein du xylème. Les parois des tissus corticaux résiduels (situés en périphérie du bois) ne sont pas ou peu réactives. La coloration est homogène et la réaction reproductible sur les 30 échantillons de chènevotte testés. La seule précaution à prendre concerne le fait que la coloration faiblit après plusieurs heures.

Réaction de Maïle : L'objectif de cette réaction est de mettre en évidence les sous-unités S (Syringyle) et G (Gaïacyle) composant les lignines. Comme la réaction précédente, elle est réalisée sur des coupes de matériel et les observations sont faites en fond clair.

Sur des coupes transversales de chènevotte (Figure II.5, C-F), on peut voir une forte coloration rouge des parois du xylème. Cette coloration indique que les unités S (Syringyle) prédominent dans la composition des lignines imprégnant les parois. Dans le détail, on peut voir que les parois des vaisseaux du xylème secondaire et les parois du xylème primaire sont colorées en brun indiquant la présence majoritaire de gaïacyle dans ces parois. Les parois des cellules de la moelle (parenchyme médullaire) et des cellules fibreuses sont non réactives.

c. Mise en évidence des composés aromatiques par autofluorescence

- **Observation en microscopie d'épifluorescence** : Une première approche est effectuée en champ large sur les mêmes coupes que précédemment. La source de lumière est une lampe à vapeur de mercure qui émet un spectre de raies pour un intervalle assez large de longueurs d'onde (de proche UV au proche IR). Des cubes filtres sont disposés dans le trajet optique afin de sélectionner à l'excitation un intervalle de longueurs d'onde. Les caractéristiques des cubes filtres A, I3 et N2.1 utilisés sont indiqués dans la légende de la Figure II.6.

On observe que les matériels en l'état fluorescent principalement dans le bleu sous excitation dans le proche UV et le vert jaune sous excitation autour de 480 nm alors que l'on observe une très faible fluorescence dans le rouge sous excitation dans le vert.

Cette technique est peu informative concernant la nature des composés fluorescents. Elle pourrait permettre de suivre l'extraction des composés au cours du processus de traitement de la matière.

- **Obtention de spectres à l'émission en microscopie confocale mono ou bi photonique** :

Ces observations ont été réalisées avec le souci de mieux caractériser la matière. Deux types de techniques ont été réalisés. L'une a fait appel à la microscopie monophotonique en utilisant comme source d'excitation une diode à 405 nm. La seconde a fait appel à de la microscopie biphotonique en utilisant un laser infrarouge pulsé accordable en longueur d'onde.

Dans les deux cas, des piles d'images xy d'intensité de la fluorescence émise dans 40 fenêtres spectrales de 10 nm de largeur ont été acquises. Il est alors possible de tracer des spectres à l'émission (intensité de la fluorescence émise en fonction de la longueur d'onde d'émission) dans différentes zones d'intérêt au sein des tissus, puis de tracer un spectre moyen après normalisation. Ces spectres peuvent être obtenus soit à partir de coupes transversales ou longitudinales.

- Les résultats obtenus avec la diode à 405 nm sont présentés sur la Figure II.7. Deux types de spectres sont obtenus selon les parois analysées. Au niveau des parois du xylème, les spectres à l'émission présentent deux pics, l'un dont le max est situé entre 470-480 nm et un second entre 515-525 nm, l'intensité du premier pic est toujours plus élevée que celle du second (100/70). Les spectres sont similaires au niveau des parois tangentielles, des jonctions tri cellulaires ou des vaisseaux du xylème. Au niveau des tissus

parenchymateux corticaux ou de la moelle, les spectres présentent un seul pic à 530-535 nm ou deux pics, comme précédemment, mais avec des intensités relatives voisines (100/90).

- En bi photons, les spectres (Figure II.8) ont été réalisés avec des longueurs d'onde à l'excitation comprises entre 700 et 800 nm. Dans les tissus du xylème, on observe des spectres avec un seul pic à 460-465 nm précédé d'un épaulement à 420-430 nm. Cet épaulement est d'autant plus marqué que la longueur d'onde à l'excitation est proche de 700 nm.

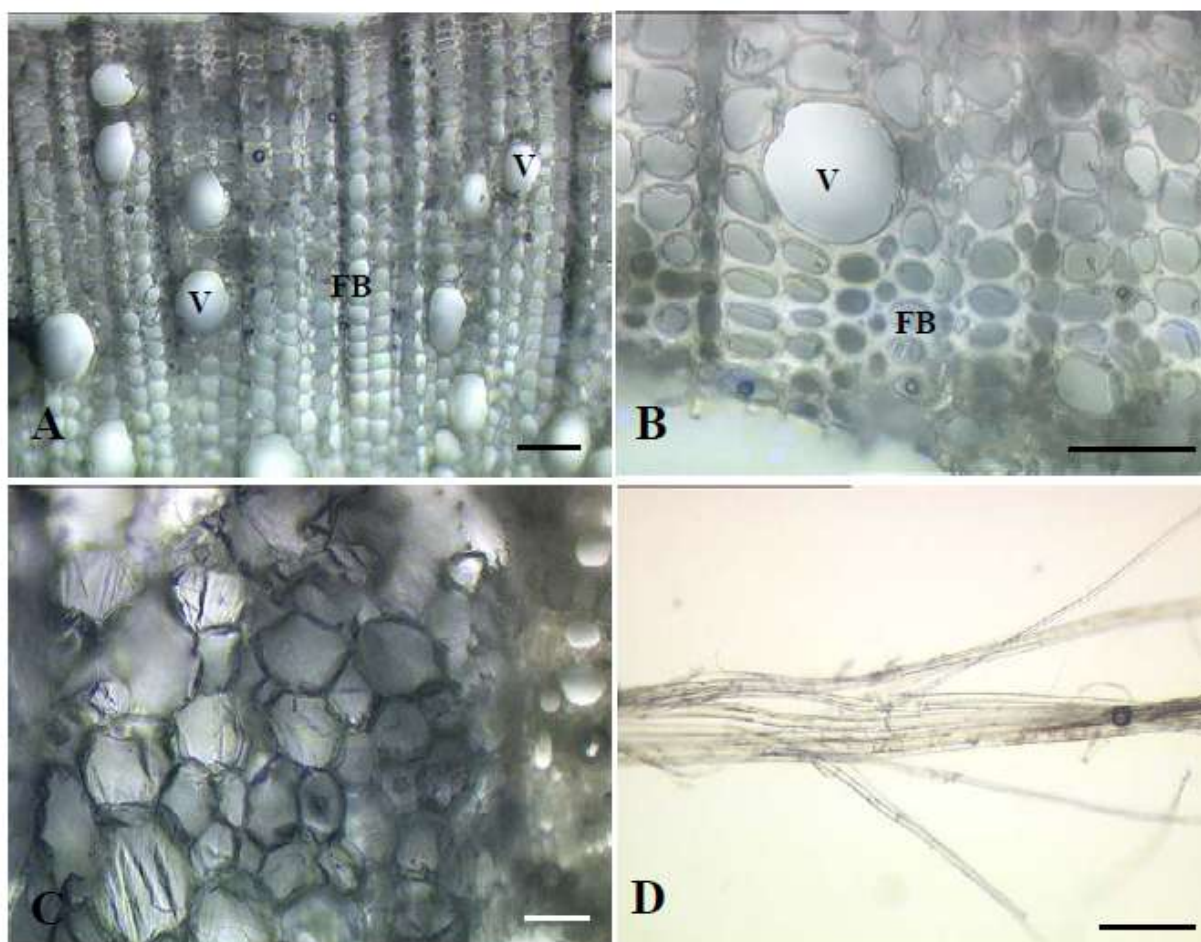


Figure II.4 : Image en microscopie fond clair de coupe transversale (A-C) de chènevotte et de fibres cellulosiques résiduelles (D)

A, B et C Barre = 55 μm ; D Barre = 40 μm .

A-B : détail du bois ; V, vaisseau du bois, et FB, fibre du bois ; C : moelle.

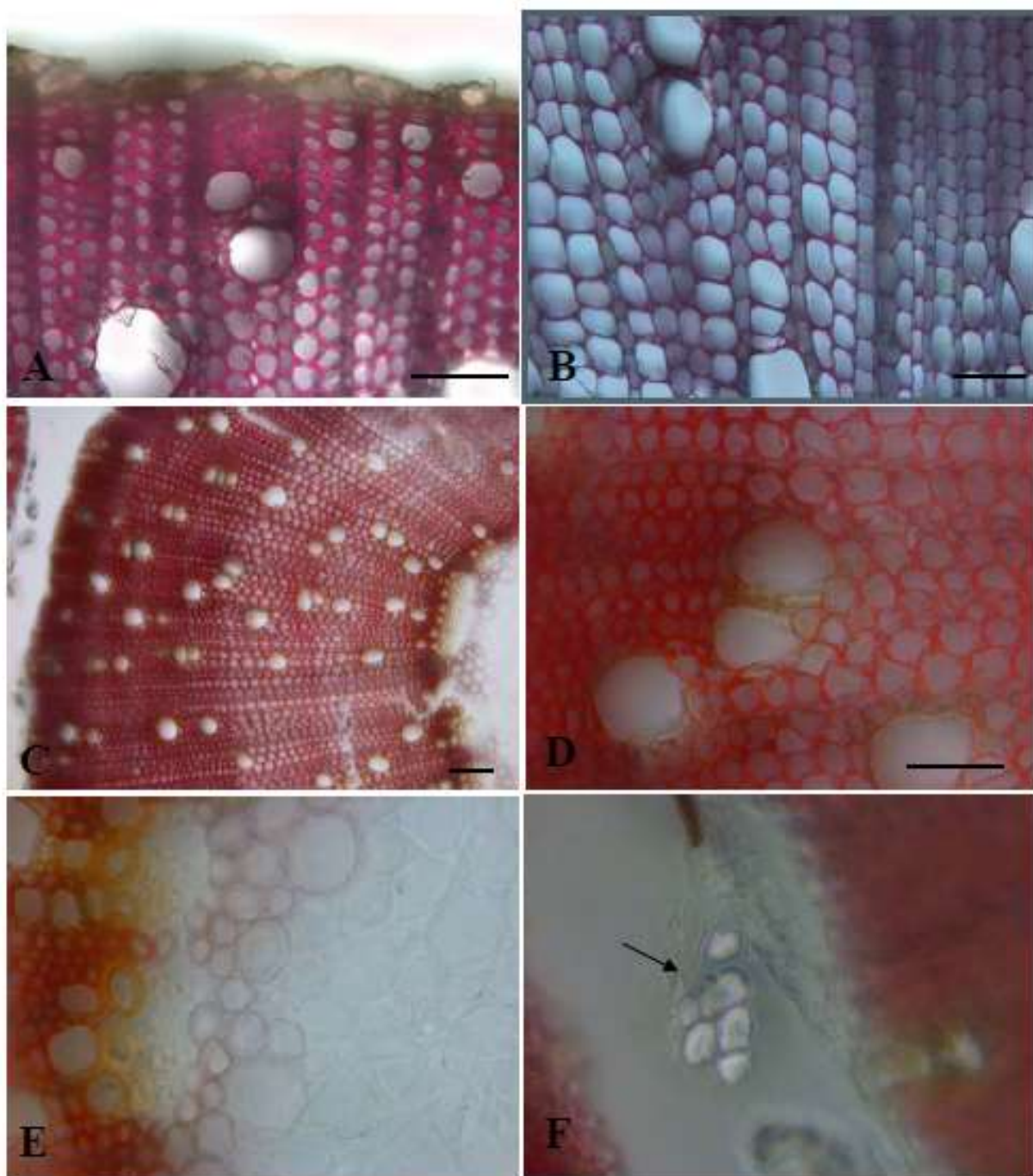


Figure II.5 : Images de coupes transversales de chènevotte après coloration au phloroglucinol (A-B), ou réaction au Maile (C-F). On note que les parois de la moelle (E) et des fibres (F ; flèches) sont faiblement ou non réactives. Les parois des vaisseaux sont colorées en brun, alors que celles des fibres du bois sont colorées en rouge, indiquant une différence de composition. Barre = 100 μ m

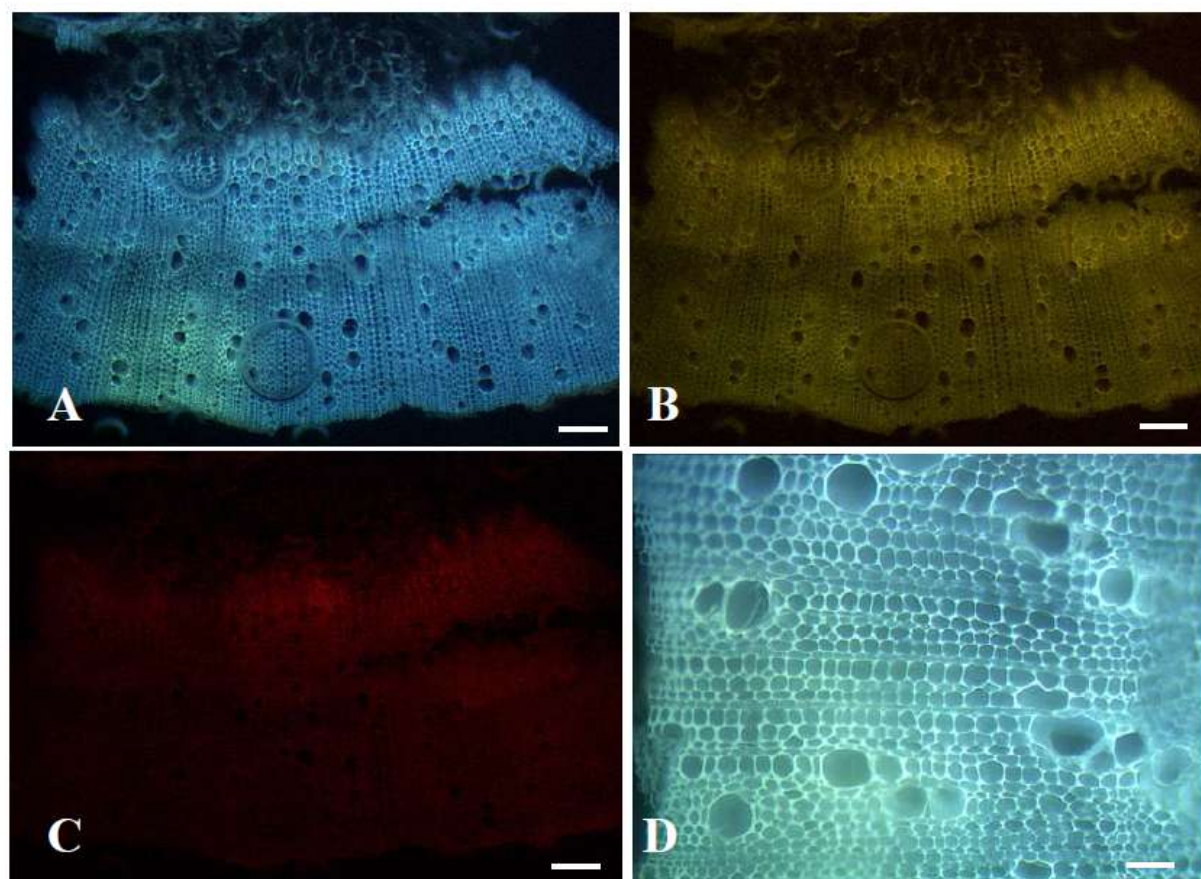


Figure II.6 : Image en microscopie de fluorescence. Les images A à C ont été acquises avec les cubes filtres A, I3 et N2.1

Cube filtre A : filtre à l'excitation 340-380 nm, miroir dichroïque : 400 nm ; filtre à l'émission : > 420 nm. Cube I3: Filtre d'excitation : 450-490 nm, miroir dichroïque : 520 nm ; filtre d'émission : > 515 nm. Et cube N2.1 : filtre d'excitation : 525-560 nm, miroir dichroïque : 580 nm ; filtre émission : > 590 nm.

Les images A à C ont été acquises avec les mêmes temps d'acquisition et de réglages caméra.

On note que les tissus fluorescent principalement dans les bleu et vert-jaune.

L'image D montre un détail du bois.

A, B et C ; barre = 200 μm ; D barre = 50 μm .

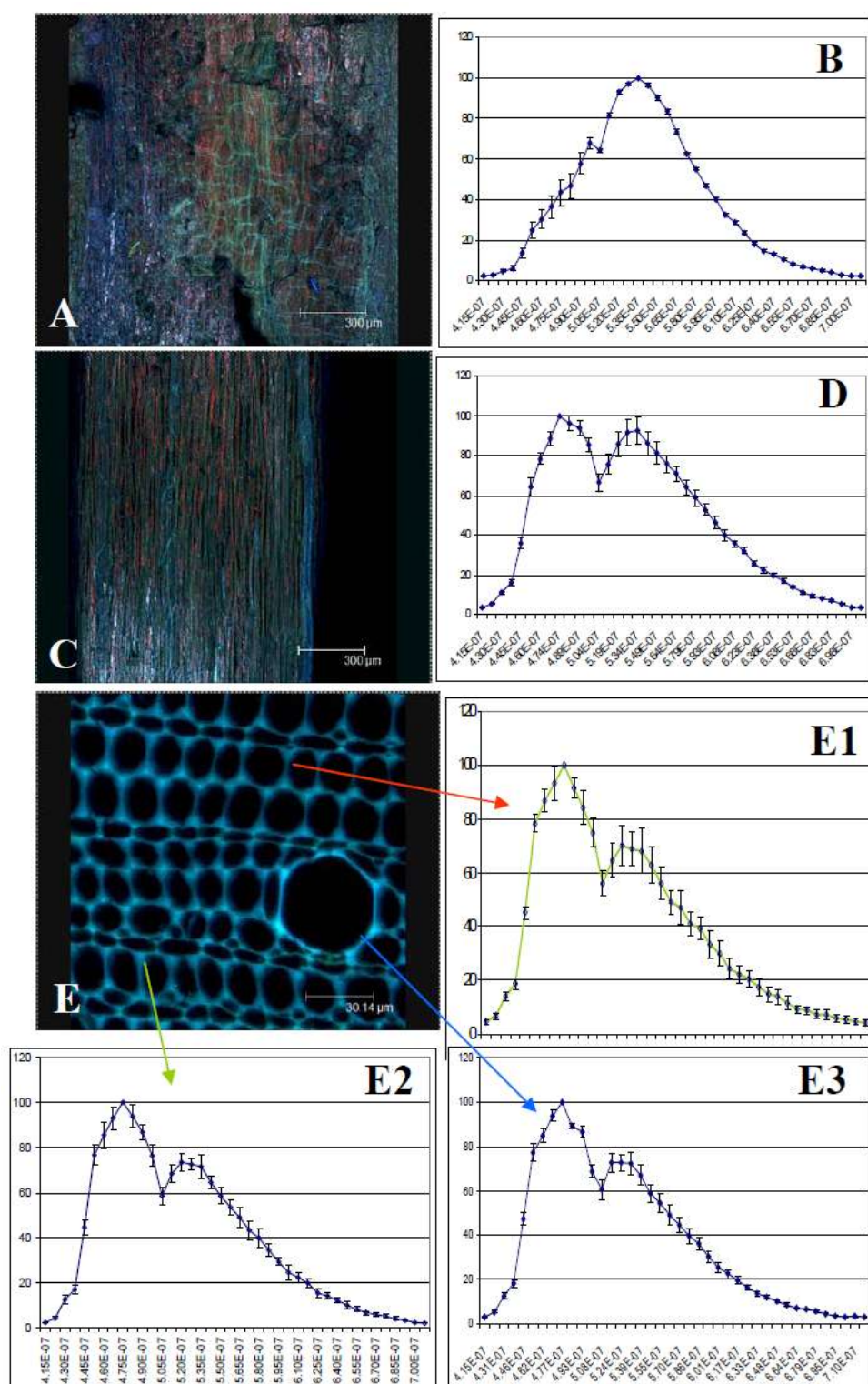


Figure II.7 : Image en microscopie confocale (excitation 405 nm) et spectres obtenus à l'émission

A et B : tissus corticaux ; C et D : moelle ; E : xylème avec E1 parois tangentielles, E2 jonctions tri-cellulaires et E3 parois des vaisseaux

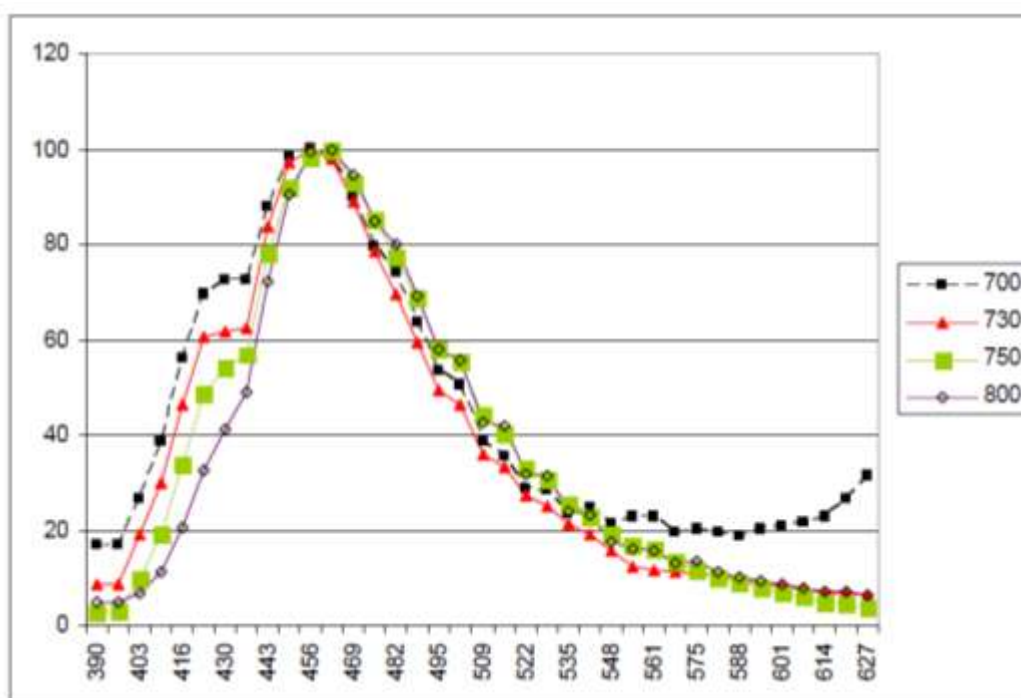


Figure II.8 : Spectres à l'émission des parois du xylème avec des longueurs d'onde à l'excitation de 700 à 800 nm, obtenus en microscopie confocale biphotonique

II.1.1.3. Analyse quantitative des constituants de la chènevotte

Plusieurs constituants chimiques de la matière végétale ont été évalués : les principaux minéraux présents, les composants de la fraction pariétale que sont la cellulose, les hémicelluloses et les lignines, et d'autres constituants tels que les protéines, les pectines et les composés lipidiques.

a. Composition de la matière minérale

Les minéraux (Ca, Mg, Na, K) ont été dosés par spectrophotométrie d'absorption atomique et le phosphore par colorimétrie. Les résultats sont représentés dans le Tableau II.4 tandis que le Tableau II.5 donne un point de comparaison bibliographique.

Le potassium et le calcium sont les deux éléments dosés dans les quantités les plus abondantes.

La somme des teneurs en minéraux analysés représente 51 % de la matière minérale totale évaluée à 2,77 %/MS.

En se référant à la littérature, la chènevotte contiendrait 1 à 5 % de silice (Bag *et al.* 2011) mais aussi des métaux tels que le cobalt, le nickel, et le fer (Barta, Kreuger, et Björnsson 2013) qui pourraient être complémentaires aux minéraux analysés. Les métaux lourds sont aussi présents dans la chènevotte et leur teneur peut atteindre 3 % en masse pour Cd et Pb lorsque la plante est cultivée dans un sol contaminé. En effet, le chanvre accumule les métaux lourds des sols sur

lesquels il est cultivé, pour les redistribuer dans toutes les parties de la plante et surtout dans la chènevotte (Bouloc 2006). Enfin, les teneurs en minéraux sont extrêmement variables en fonction de la nature du sol (riche en minéraux, usage de fertilisant, ...).

Tableau II.4 : Composition en minéraux de la chènevotte (n=1)

	%/MM	%/MS
Calcium	14,4	0,403
Phosphore	1,6	0,044
Magnésium	3,7	0,103
Sodium	0,2	0,004
Potassium	31,1	0,871

Tableau II.5 : Composition en minéraux de la chènevotte (Bouloc 2006)

Composition chimique	
Azote	0,4 à 1 %
P₂O₅	0,2 à 0,5 %
K₂O	0,96 à 1,5 %
CaO	0,89 à 1,4 %
MgO	0,02 à 0,06 %
Na	0,09 %
S	0,16 %
Bore	21 ppm du produit brut
Cuivre	0,6 ppm du produit brut
Zinc	0

% = pourcentage de matière sèche

b. Cellulose, Hémicelluloses, Lignines

Les fractions pariétales que sont la cellulose, les hémicelluloses et les lignines, ont été évaluées par la méthode *Van Soest and Wine* encore appelée méthode ADF-NDF (Van Soest and Wine 1967). Cette méthode gravimétrique est basée sur la différence de solubilité des constituants de la matière végétale dans 2 types de détergents :

- Un détergent neutre ou NDF (*Neutral Detergent Fiber*), à base d'EDTA. Il solubilise l'ensemble des constituants non pariétaux : protéines, pectines, composés lipidiques, cires, La partie insoluble par extraction au détergent neutre NDF permet d'estimer la teneur en matière sèche fibreuse (cellulose, hémicelluloses et lignine).

- Un détergent acide ou ADF (*Acid Detergent Fiber*) à base de CTAB et d'acide sulfurique dilué. Il solubilise l'ensemble des composés non pariétaux ainsi que les hémicelluloses. Le résidu insoluble ADF contient les lignines et la cellulose. L'attaque des lignines du résidu ADF par un oxydant puissant (permanganate de potassium) permet d'atteindre un résidu ne contenant dans sa fraction organique que de la cellulose.

La matière sèche fibreuse de la chènevotte, constituée de cellulose, des hémicelluloses et de lignines, représente 86,8 % de la matière sèche totale (Tableau II.6). Par conséquent les constituants non fibreux comme les protéines, les substances pectiques et les composés lipidiques sont entraînés et solubilisés dans les extractibles NDF et représentent 13,2 % de la matière sèche totale.

Tableau II.6 : Analyse chimique de la chènevotte par la méthode Van Soest and Wine (%/MS)

Résidu NDF	86,8 ± 0,1
Extractible NDF	13,2 ± 0,1
Résidu ADF	68,6 ± 0,5
Extractible ADF	31,4 ± 0,5
Taux de cellulose	50,6 ± 3,1
Taux de Lignine	18,0 ± 2,8
Taux d'hémicelluloses	18,2 ± 0,5

La fraction pariétale de la chènevotte est composée majoritairement de cellulose et de quantités équivalentes d'hémicelluloses et de lignines (Figure II.9).

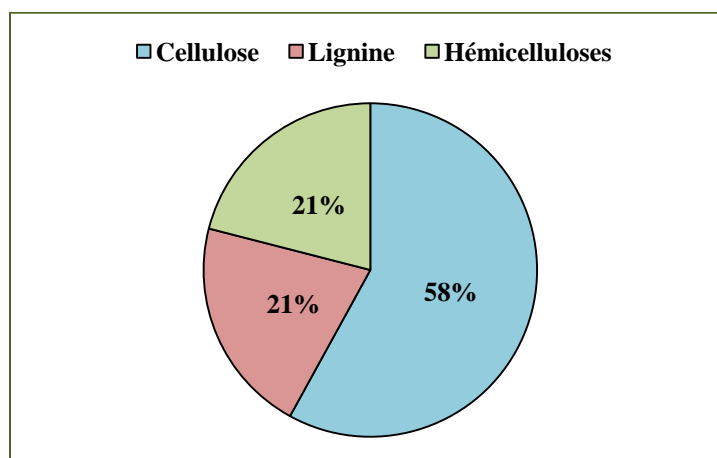


Figure II.9 : Répartition de la lignine, cellulose et hémicelluloses dans la fraction pariétale. Cas de la chènevotte

Les teneurs en lignines et hémicelluloses sont élevées. Ce coproduit paraît à première vue une source intéressante pour l'extraction des composés phénoliques et plus particulièrement des acides *p*-coumarique et férulique, qui peuvent se trouver à l'état libre dans les parois cellulaires mais surtout être liés à la lignine et aux hémicelluloses par des liaisons esters et éthers.

Le taux de cellulose mesuré dans cette variété de chanvre est supérieur à ceux publiés dans la littérature. Les taux des hémicelluloses et de lignine sont, dans la plupart des cas, inférieurs ou comparables à ceux de la littérature (Tableau II.7). Les différences observées pour les teneurs en cellulose, hémicelluloses et lignine dans la littérature et aussi par rapport à nos résultats expérimentaux s'expliquent par les différentes méthodes de dosage, qui ne sont pas totalement efficaces et présentent des erreurs qui sous-estiment ou surestiment les valeurs (Magro 1995). Elles s'expliquent aussi par les différentes variétés de chanvre ainsi que par leurs origines.

Tableau II.7 : Composition chimique de la chènevotte provenant de différentes variétés de chanvre

Composition de la matière sèche fibreuse dans la chènevotte (%)				
	Cellulose	Hémicelluloses	Lignine	Variété du chanvre
Etude actuelle	50,6 ± 3,1 (a)	18,2 ± 0,5 (a)	18,0 ± 2,8 (a)	Français
Correia, Roy, et Goel 2001	33,4 (b)	38,9 (b)	21,2 (c, d)	Canadien
Lavoie et Beauchet 2012	40 ± 1 (f)	26 ± 1 (e)	19 ± 0,5 (c)	Canadien
Turner, Elsohly, et Boeren 1980	43,0 – 43,5	12,0 – 12,3	–	Mexicain
Cappelletto <i>et al.</i> 2001	33 – 37 (b)	16 – 20 (b)	17 – 22 (c)	Italien et Français
Vignon, Garcia-Jaldon, et Dupeyre 1995	44 (g)	18 (g)	28 (c)	Français
Gandolfi <i>et al.</i> 2013	44 (h)	25 (h)	23 (c)	Italien
Bouloc 2006	45 - 60	15 - 20	15 - 30	

(a) Van Soest and Wine method.

(b) TAPPI T203 method: determination of α , β and γ cellulose. On bleached or delignified pulps.

(c) TAPPI T222 ou ASTM D1106-56 method: acid insoluble lignin (Klason lignin) in wood and pulp.

(d) TAPPI T250 method: chromatographic analysis of purified pulp.

(e) TAPPI T212 method: one percent sodium hydroxide solubility of wood and pulp.

(f) ASTM D1103-60 method: similar to (b). solubilisation of shorter chains of cellulose and degraded cellulose using a sodium hydroxide mixture.

(g) 1) Elimination des lipides, cires et pectines ; 2) Solubilisation of hemicelluloses in 2% NaOH ; Alkaline Hydrolysis ; 4) Bleaching 5) Recovery of precipitated cellulose.

(h) 1) Bleaching (holocellulose) ; 2) Alkaline Hydrolysis. Published by Yokoyama, Kadla, and Chang 2002.

Les compositions exposées dans le Tableau II.7 ont permis de proposer une comparaison des répartitions en composés pariétaux (Figure II.10). De manière générale, la cellulose est la fraction pariétale majoritaire (47-58 %) alors que les compositions en hémicelluloses et lignines

sont équivalentes (20-30 %). La plus grande variabilité est observée dans le cas des hémicelluloses. En général, des taux élevés en hémicelluloses peuvent être expliqués, soit par une période de récolte précoce à laquelle la plante n'est pas complètement mature ; soit par le fait que la chènevotte provient de la partie supérieure de la tige (Cappelletto *et al.* 2001).

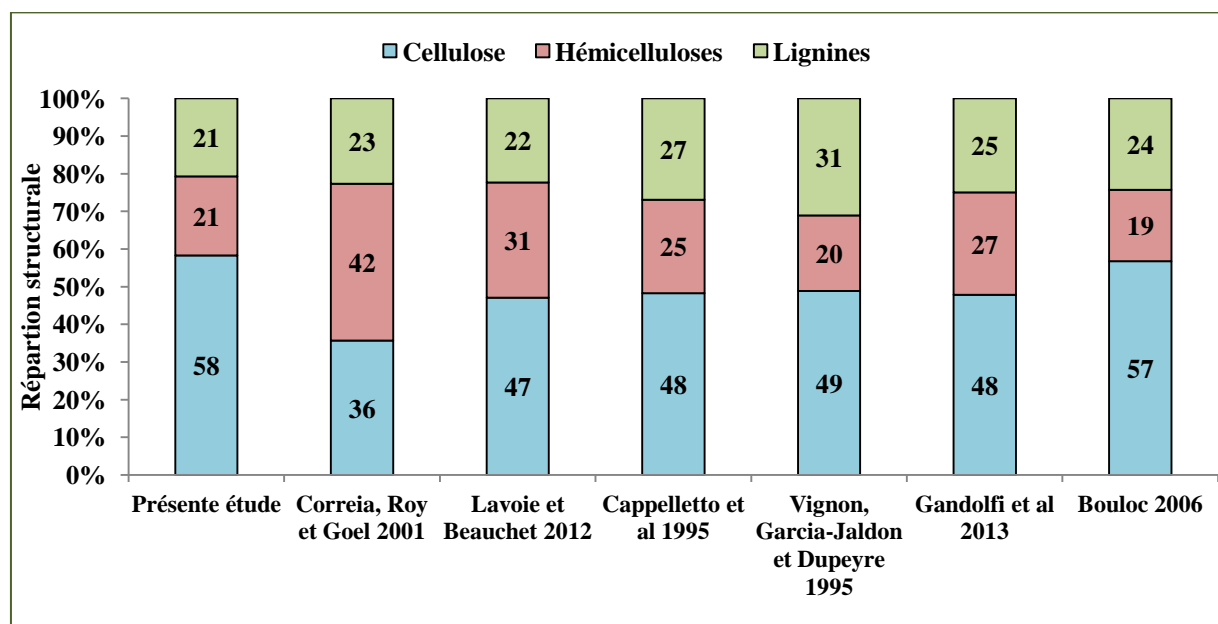


Figure II.10 : Répartition de lignines, cellulose et hémicelluloses dans la fraction pariétale de différentes variétés de chènevotte

c. Les composants minoritaires

En dehors de la fraction pariétale majoritaire, la matière première est constituée de composés organiques minoritaires tels que les protéines, les substances pectiques et les cires et corps gras. Ces derniers sont des composés non liés chimiquement aux composés structuraux et aisément extractibles, sous des conditions opératoires choisies. Ils ont été déterminés comme suit :

- **Les protéines** ont été dosées selon la méthode de Kjeldhal (norme NF V18-100) qui consiste à transformer par minéralisation l'azote organique contenu dans l'échantillon en azote minéral (ammoniaque) puis à doser cette ammoniaque par dosage acido-basique. Par convention, le taux de protéines dans l'échantillon est obtenu en multipliant le pourcentage d'azote total par un coefficient (ou facteur) de conversion qui prend en compte la masse molaire moyenne des acides aminés de ces protéines par rapport à la masse molaire de l'azote. Dans notre cas, le facteur appliqué est de 6,25 sur la base d'une teneur moyenne en azote dans les protéines de 16 % (AOAC 1990).

- **Les pectines** sont prédominantes dans les lamelles moyennes. Elles maintiennent ensemble les cellules des tissus végétaux. Le taux de pectines a été déterminé selon la méthode de Blumenkrantz et Asboe Hansen (Blumenkrantz et Asboe-Hansen 1973). Cette méthode consiste à déterminer la teneur en acide galacturonique majoritairement présent dans les substances pectiques. Le dosage repose sur la formation d'un complexe chromophore de couleur rose qui est dosé par spectroscopie d'absorption UV. Ce chromophore apparaît quand l'acide uronique chauffé à 100 °C dans du tétraborate/acide sulfurique concentré réagit avec le méta-hydroxydiphényle. Les teneurs en pectines sont alors exprimées en % d'équivalent d'acide galacturonique.
- **Les cires et corps gras** : leur teneur a été déterminée par extraction Soxhlet au cyclohexane (norme NF V03-908).

Tableau II.8 : Teneurs en protéines, pectines et cires et corps gras dans la chènevotte

Composants minoritaires	%/MS	%/MO
Protéines	3,4 ± 0,1	3,5 ± 0,1
Pectines (équivalent acide galacturonique)	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,1
Cires et corps gras	2,6	2,6
Minéraux	2,8	
Total	10,6	

Dans la littérature, des teneurs en protéines comprises entre 1 et 3 % et des teneurs en pectines comprises entre 1 et 4 % ont été relevées (Vignon, Garcia-Jaldon, et Dupeyre 1995 ; Gandolfi *et al.* 2013). Notons que les teneurs en pectines dépendent fortement de l'étape préalable de rouissage du chanvre qui est potentiellement mise en œuvre.

La teneur en cires et corps gras dans notre lot de chènevotte est cohérent avec les valeurs de la littérature (Gandolfi *et al.* 2013) pour des extractions au dichlorométhane ou à l'acétone.

II.1.1.4. Extraction et analyse de la fraction phénolique

Parmi les familles de molécules extractibles, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux composés phénoliques. Afin de quantifier ces derniers, une série d'extractions à l'échelle analytique a été réalisée. Les conditions choisies favorisent l'extractibilité : matière fortement broyée (0,5 mm), ratio liquide/solide élevé (L/S = 100), température élevée (reflux) et durée d'une heure. Ces conditions permettent de minimiser les limitations cinétiques et diffusionnelles, et conduisent au potentiel en molécules extractibles qui est défini comme le rapport entre la

matière organique ou sèche extraite et la matière organique ou sèche initiale. Ces extractions analytiques seront dénommées extraction Fibertec, du nom de l'appareillage mis en œuvre pour les réaliser (FibertecTM, Foss).

Nous avons choisi, en nous référant à la littérature, trois solvants classiques pour l'extraction des composés phénoliques : l'eau, l'éthanol 95 % et l'éthanol 60 % (Y. Sun *et al.* 2006 ; Liu *et al.* 2006 ; Xie *et al.* 2009 ; Quan, Sun, et Qu 2009). L'eau est un solvant polaire pour lequel les polyphénols ont une grande affinité. De plus c'est le solvant vert par excellence selon le règlement européen REACH (enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des produits chimiques). L'éthanol, solvant de polarité légèrement inférieure, pouvant être classé comme solvant alimentaire est couramment utilisé pour l'extraction des polyphénols et des acides phénoliques. Le mélange des deux solvants précédents, l'éthanol et l'eau, dans une proportion de 60/40 (v/v), a été choisi pour combiner leurs avantages pour l'extraction des composés phénoliques. Ces solvants sont facilement transférables dans des extractions à l'échelle industrielle. A noter que l'eau et l'éthanol sont classés comme solvants GRAS (*Generally Recognized As Safe* ou généralement considérés comme solvants sûrs).

Les rendements en composés extractibles sont représentés à la Figure II.11 et au Tableau II.9.

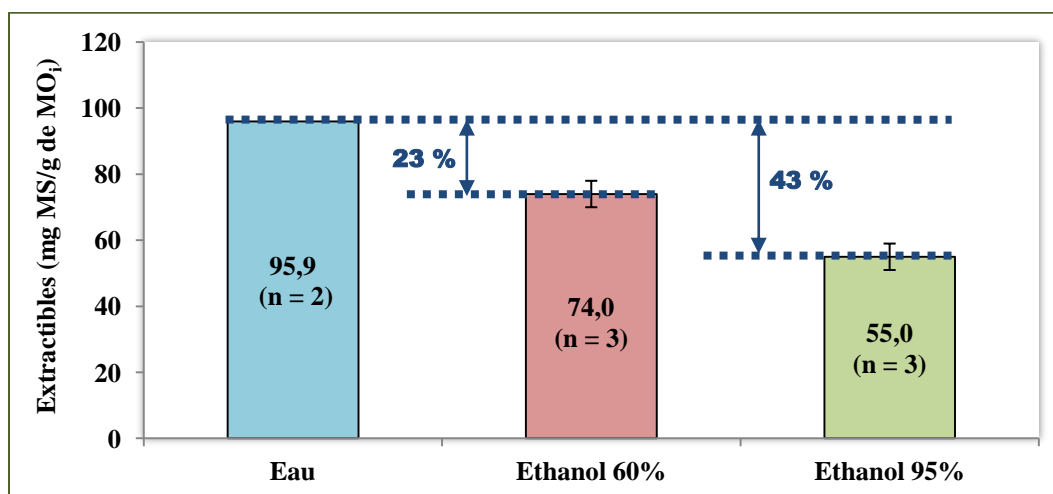


Figure II.11 : Rendements en extractibles Fibertec (L/S = 100, reflux, 1 h). Cas de la chènevotte

Tableau II.9 : Rendements en extractibles Fibertec de la chènevotte

Solvant	Extractibles (rendements)		
	mg MS _E /g MS _i	mg MS _E /g MO _i	mg MO _E /g MO _i
Eau (n = 2)	93	96	82
Ethanol 60 % (n = 3)	72 ± 4	74 ± 4	68 ± 9
Ethanol 95 % (n = 3)	53 ± 4	55 ± 4	50 ± 2

MS_E : Matière sèche extraite ; MO_E : Matière organique extraite,

MS_i : Matière sèche initiale ; MO_i : Matière organique initiale.

Une extraction aqueuse conduit à l'extraction de 70 % des molécules extraites par NDF.

Les rendements d'extraction varient en fonction de la polarité du solvant. Le caractère hydrophile des extractibles de la matière végétale conduit à une extractabilité doublée pour un solvant aqueux par rapport à un solvant alcoolique. Un solvant hydro-alcoolique conduit à un rendement d'extraction intermédiaire. Ainsi 23 % des extractibles à l'eau sont insolubles dans l'éthanol 60 % et 43 % sont insolubles dans l'éthanol 95 %.

Des travaux internes antérieurs effectués au LCA et ceux de Bag *et al.* 2011 et de Cappelletto *et al.* 2001 montrent que les substances solubles dans l'eau sont formées principalement par des composants non cellulotiques. L'extraction de la chènevotte par l'eau à 100 °C conduit à l'extraction des composés phénoliques ainsi que des pectines, tannins, protéines, sucres, gommes, pigments et matières minérales en plus faibles proportions.

Les composés phénoliques totaux ou polyphénols ont été dosés dans les extraits par la méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton et Rossi 1965) en utilisant l'acide gallique comme molécule étalon. Ce polyphénol est le composé traditionnellement utilisé comme référence dans la littérature. Néanmoins, comme nos acides phénoliques d'intérêt se trouvent être les acides férulique et *p*-coumarique, nous avons évalué la réponse de solutions modèles de ces molécules vis-à-vis d'un étalonnage avec l'acide gallique. Pour des solutions préparées à 1 g/L en acides férulique et *p*-coumarique, la réponse du dosage est de 0,55 g/L en équivalent acide gallique. Ainsi, le choix d'étalon influence les résultats du dosage. Dans notre cas, l'acide gallique conduit à une sous-estimation de l'apport des acides phénoliques sur la concentration en polyphénols totaux.

Les rendements en polyphénols dans les extraits sont exprimés en mg d'Equivalent Acide Gallique (EAG) par g de MO_i (matière organique initiale) (Figure II.12 et Tableau II.10). La

teneur en polyphénols dans les extraits est aussi représentée comme le rapport entre la quantité de polyphénols (EAG) et la quantité de matière organique extraite (MO_E).

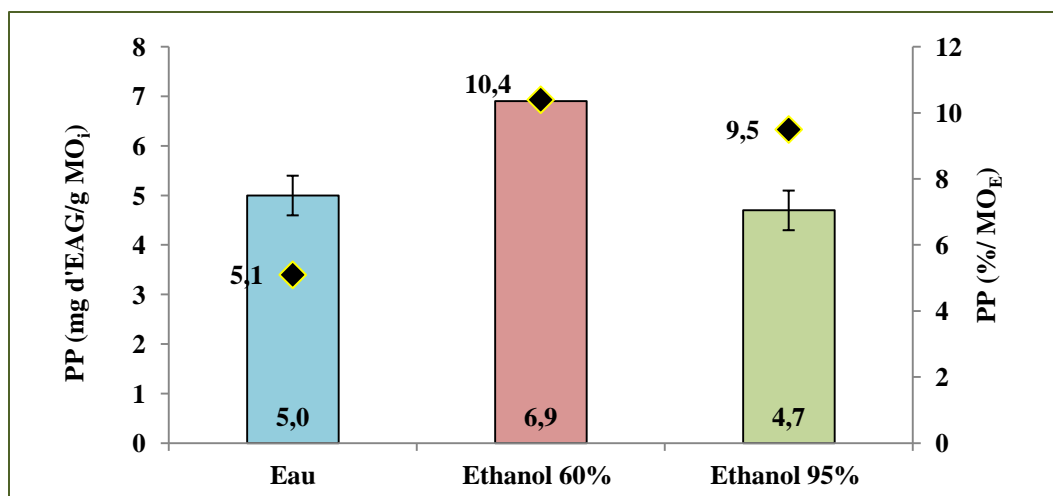


Figure II.12 : Rendements d'extraction en composés phénoliques totaux et teneurs en composés phénoliques des fractions extraites (♦). Cas de la chènevotte

De manière générale, la teneur en polyphénols des fractions est comprise entre 4 et 10 % avec un maximum obtenu pour une extraction à l'éthanol 60 %. Il existe une synergie entre l'éthanol et l'eau qui solubilisent des classes de polyphénols complémentaires. Les extraits obtenus contiennent 10,4 % de composés phénoliques par rapport à la matière organique extraite pour un mélange extracteur éthanol/eau. Cet extrait est ainsi le plus riche et le plus sélectif en polyphénols.

Tableau II.10 : Rendements et teneurs en polyphénols totaux dans les extraits. Cas de la chènevotte

Solvant	PP (rendements)		PP (teneurs)	
	mg/g MS_i	mg/g MO_i	%/ MS_E	%/ MO_E
Eau	$4,8 \pm 0,4$	$5,0 \pm 0,4$	$4,3 \pm 1,1$	$5,1 \pm 1,2$
Ethanol 60 %	$6,7 \pm 0,1$	$6,9 \pm 0,1$	$9,4 \pm 0,5$	$10,4 \pm 1,5$
Ethanol 95 %	$4,6 \pm 0,4$	$4,7 \pm 0,4$	$8,7 \pm 0,4$	$9,5 \pm 0,3$

Parmi les composés phénoliques totaux, trois molécules ont été dosées par HPLC : l'acide *p*-coumarique (*ApC*), l'acide férulique (*AF*) et la vanilline (*Van*) (Figure II.13).

La méthode analytique a été développée en se référant à Lu *et al.* 2005 et aux références citées dans le Chapitre I. L'appareil utilisé est le Dionex Ultimate 3000 HPLC couplé à un détecteur à barrettes de diodes Dionex UVD340U. La séparation est réalisée sur une colonne apolaire C_{18}

Omnispher 3 (100 x 3 μm x ID 3 mm Varian), avec un débit de 0,7 mL.min⁻¹, à 30 °C. L'élution est réalisée à l'aide d'un gradient de deux solvants : l'acétonitrile et l'eau acidifiée (H_3PO_4 10⁻² M).

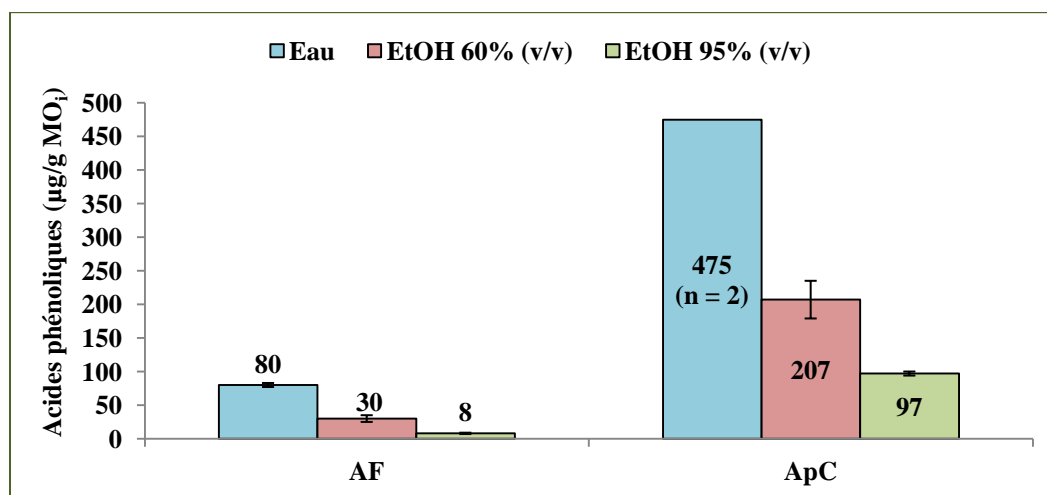


Figure II.13 : Rendements d'extraction en acides phénoliques en fonction du solvant. Cas de la chènevotte ($n = 3$)

Les rendements en acides *p*-coumarique (ApC) et férulique (AF), calculés par rapport à la matière organique initiale sont faibles. La chènevotte est ainsi une matière première pour laquelle les acides phénoliques ne sont que peu présents sous forme libre. Notons que la vanilline n'était présente qu'à l'état de traces ($< 5 \mu\text{g/g MO}_i$).

L'extractibilité des ApC et des AF diminue avec la diminution de la polarité du solvant d'extraction alors que le rendement en composés phénoliques totaux est maximal dans les extraits à l'éthanol 60 %.

Les rendements d'extraction en ApC sont bien supérieurs aux rendements en AF. Un facteur de 6 à 12 a été calculé pour le ratio ApC/AF quel que soit le solvant. Par contre, l'éthanol est plus sélectif de l'acide *p*-coumarique que de l'acide férulique puisque le ratio ApC/AF passe de 6 pour l'eau à 12 pour l'éthanol 95 %.

Selon la littérature, des limitations cinétiques liées à la température peuvent intervenir lors de l'extraction. Selon Galanakis *et al.*, le coefficient d'activité du solvant dépend de deux paramètres : le composé phénolique étudié et la température. L'extraction de l'acide férulique et de l'acide *p*-coumarique à 25 et 60 °C, respectivement avec le méthanol et l'acétone a été étudiée. Aucun effet de température n'a été observé, ce qui n'était pas le cas pour 12 autres composés phénoliques étudiés (Galanakis *et al.* 2013). Selon une autre étude, l'effet de la température (20 ou 100 °C) sur l'extraction aqueuse ou éthanolique des composés aromatiques

de la lignine (en batch ou Soxhlet respectivement) a été étudié. Le taux de composés aromatiques augmente avec la température pour l'extraction éthanolique alors qu'il reste constant dans le cas de l'extraction à l'eau (Bag *et al.* 2011). En s'appuyant sur l'étude de Galanakis *et al.*, le rendement en composés phénoliques totaux maximal dans l'éthanol 60 % peut être expliqué par l'effet diffusionnel du solvant dans la matière. Un mélange hydro-alcoolique semble être le solvant adéquat pour l'extraction des composés phénoliques. L'eau conduit au gonflement de la matière végétale et permet d'augmenter son extractibilité, en facilitant la pénétration du solvant dans la matrice solide (Galanakis *et al.* 2013).

Les rendements en acides phénoliques peuvent aussi être représentés par rapport à la matière organique extraite et par rapport aux composés phénoliques totaux extraits (Tableaux II.11). La sélectivité maximale du solvant aqueux est une nouvelle fois confirmée. Ces résultats permettent de définir la proportion en acides férulique et *p*-coumarique par rapport à la totalité des composés phénoliques mais aussi par rapport à la quantité de composés extractibles. Les extraits aqueux sont caractérisés par des rendements en acide férulique et acide *p*-coumarique respectivement de 0,1 % et 0,4 %, ce qui correspond à 1,2 % et 9,3 % de la fraction phénolique. Ce rendement est inférieur dans le cas du mélange éthanol-eau et encore plus faible dans le cas de l'éthanol.

Tableau II.11 : Rendements d'extraction en acides férulique et *p*-coumarique. Cas de la chènevotte

Rendements en acides phénoliques dans la chènevotte exprimé en					
Solvant	$\mu\text{g/g MO}_E$		$\mu\text{g/g PP}$		Ratio ApC/AF
	AF	ApC	AF	ApC	
Eau	600 *	4700 *	12000 *	93600*	6
Ethanol 60 %	400 ± 100	3100 ± 800	3600 ± 600	29900 ± 3700	7
Ethanol 95 %	200 ± 40	2000 ± 200	1600 ± 400	20600 ± 2100	12

* : Moyenne sur deux extraits analysés et non sur trois extraits comme pour le reste des valeurs

II.1.2. La poudre organique

II.1.2.1. Caractéristiques générales : origine et description

La poudre organique, encore appelée poudre organique ou fines, de couleur brune, est constituée de produits organiques et minéraux, pulvérulents et de micro fibrilles. Ce coproduit est donc le

résidu obtenu lors de la transformation du chanvre (Bouloc 2006). La poudre organique utilisée dans cette étude (Figure II.14) a aussi été fournie par « AGROFIBRE SAS » sous forme de lots de « litière en chanvre » de 20 kg. Ce lot de matière est caractérisé par une capacité d'absorption élevée de 40 L/kg d'où son emploi comme litière.



Figure II.14 : Photographie du lot de poudre organique

Notre lot de poudre organique présente une teneur en matière sèche de 89,9 % et une teneur en matière minérale de 13,2 %/MS. Ces valeurs sont comparables avec celles mentionnées dans la littérature (Bouloc 2006) (Tableau II.12).

Tableau II.12 : Caractéristiques de la poudre organique

	Notre étude	Bouloc 2006
Taux de matière sèche	89,9 ± 0,1 %	90 %
Taux de matière minérale	13,2 ± 0,1 %	De quelques % à 14,6 % en fonction de la zone de culture

II.1.2.2. Caractérisation physique, observation microscopique, évaluation des facteurs de formes

La morphologie externe de la poudre organique, obtenue sous loupe binoculaire, est hétérogène (Figure II.15). On observe la présence de petits granulats de chènevotte et de filasse. Cette hétérogénéité a été confirmée par l'analyse de la forme des particules (longueur, diamètre et facteur de forme) (Tableau II.13). En fractionnant en intervalles de granulométries, il est possible d'affiner cette étude (Tableau II.14) et de proposer la répartition des différentes particules en

fonction de leurs tailles. Ceci permet de donner une idée plus claire sur la diversité des tailles des particules.

Les 79 particules de poudre organique analysées ont une longueur moyenne de 1,6 mm et un diamètre moyen de 0,3 mm. Les particules ayant une longueur supérieure à 3 mm sont à l'origine des écart-types élevés au niveau longueur et diamètre des particules.

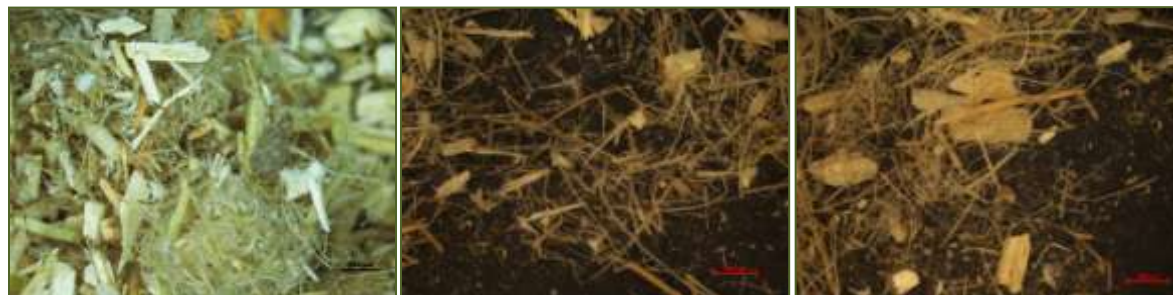


Figure II.15 : Poudre organique observée sous loupe binoculaire Z45 Nacet (France) (Barre d'échelle = 2 mm, grossissement = 4)

Tableau II.13 : Caractéristiques morphologiques et volumétriques de la poudre organique

Nombre d'images⁽¹⁾	2
Nombre de particules⁽²⁾	79
Longueur (μm)	1594 ± 1691
Diamètre (μm)	331 ± 335
Facteur de forme⁽³⁾	7,25 ± 10,39
Densité apparente avant compactage (kg/m³)⁽⁴⁾	100 ± 25
Densité tapée (kg/m³)⁽⁴⁾	136 ± 18

(1) : nombre de photos prises par la loupe binoculaire en utilisant le logiciel Archimed 4.0

(2) : nombre total de particules mesurées

(3) : longueur de la particule/diamètre

(4) : densités, duplicat, méthode de la densité tapée (250 coups/min, Densitap EDT-20 (France)), 5 séries de tassage

Tableau II.14 : Répartition des particules de la poudre organique en fonction de leurs tailles

Caractéristiques	Longueur et diamètre de la particule				
	L<500μm	500<L<1500μm	1500<L<3000μm	3000<L<6000μm 1400<d<1600μm	3000<L<6000μm d<1400μm (150-350μm)
Nombre de particules	32	12	25	2	8
Longueur (μm)	258 ± 99	952 ± 299	2297 ± 491	3401 ± 552	5258 ± 1975
Diamètre (μm)	156 ± 79	399 ± 214	467 ± 385	1523 ± 119	210 ± 91
Facteur de forme	2,0 ± 1,1	3,2 ± 0,2	9,7 ± 9,5	2,2 ± 0,2	28,3 ± 13,9

L : Longueur de la particule ; d : diamètre de la particule

La distribution granulométrique des particules de la poudre organique a été étudiée par tamisage (Figure II.16). Elle confirme l'hétérogénéité du lot et montre qu'une plus grande proportion de

particules pour des tamis de mailles de 0,2 à 1 mm (42 % de la masse totale des particules) et de maille supérieure à 6,3 mm (21 % de la masse totale des particules).

Les particules de taille $\leq 6,3$ mm rentrent dans différentes catégories : poussières, fibres fines, chènevotte, écorce de la tige broyée. Les particules de taille supérieure à 6,3 mm sont des agglomérats de fibres fines formant des "pelotes" de taille supérieure à la maille du tamis (Voir Figure II.17).

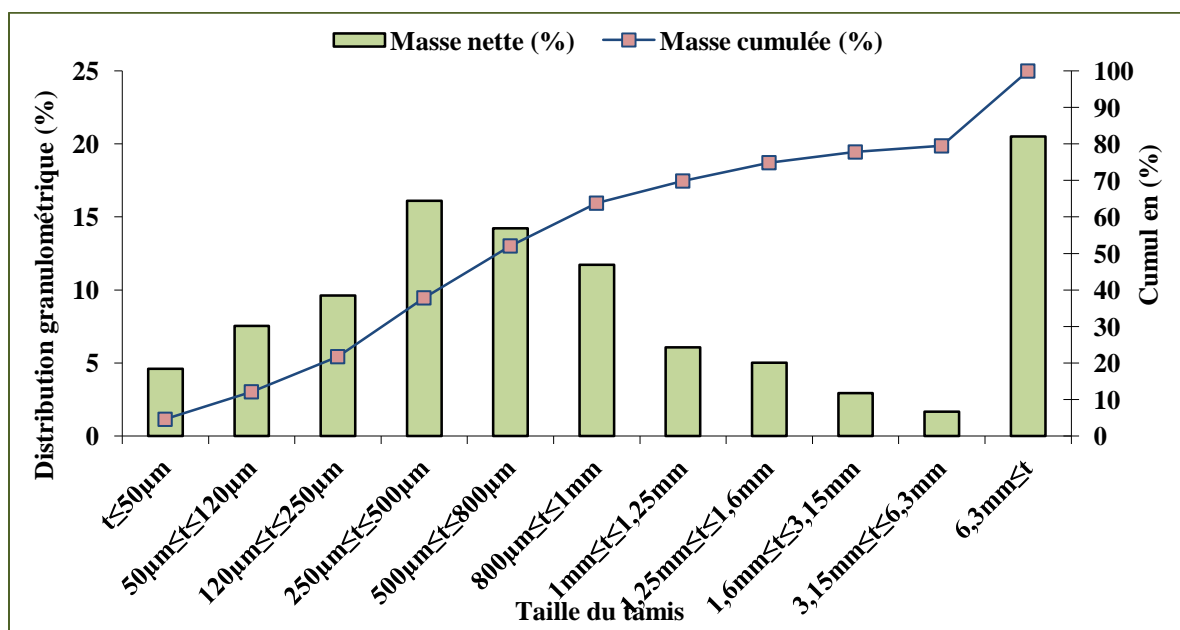


Figure II.16 : Distribution granulométrique des particules du lot de poudre organique (tamiseuse à vibration AS 300 (Retsch, Allemagne))



Figure II.17 : Fraction tamisée de la poudre organique ; taille supérieure à 6,3 mm

Les valeurs de densités apparente et tapée confirment que la poudre organique est une matière très peu dense.

Pour la suite des analyses, la matière végétale a été broyée à 0,5 mm au broyeur à couteaux Pulverisette BRO 181 (Fritsch, Allemagne).

II.1.2.3. Analyse quantitative des constituants de la poudre organique

Les analyses chimiques ont été réalisées dans des conditions opératoires similaires à celles décrites dans le cas de la chènevotte. Notons que très peu de travaux bibliographiques ont pu être mis à jour concernant la caractérisation de la poudre organique.

a. Composition de la matière minérale

Le calcium suivi du potassium sont les deux éléments les plus abondants (Tableau II.15). Ces derniers ne représentant que 30 % des minéraux présents (13,2 %/MS), la poudre organique peut alors contenir d'autres composés comme l'azote, les métaux, la silice. Les teneurs en minéraux sont comparables à celles présentées par Bouloc (Bouloc, 2006) pour le potassium et le magnésium. Les teneurs en minéraux et leurs compositions sont extrêmement variables en fonction de la zone de culture (nature du terrain : caillouteux, ...).

Tableau II.15 : Composition en minéraux de la poudre organique ($n = 1$)

	Notre étude		Bouloc 2006
	%/MM	%/MS	%/MS
Calcium	14,7	1,9	3,5
Phosphore	1,4	0,2	0,5
Magnésium	2,6	0,3	0,3
Sodium	0,2	< 0,1	-
Potassium	10,9	1,4	1,4
Azote	-	-	1,0
Carbone total (g/kg)	-	-	94

b. Cellulose, hémicelluloses, lignines

La fraction pariétale de la poudre organique constitue 61,7 % de la matière sèche. Plus précisément, sa composition est : 44,0 % en cellulose, 7,0 % en lignines et 10,7 % en hémicelluloses. Ces dernières valeurs sont différentes de celles données par Bouloc (20,6 % de cellulose, 9,1 % de lignines et 37,2 % d'hémicelluloses) ce qui peut être dû à la variété de chanvre étudiée (Tableau II.16).

Tableau II.16 : Analyse chimique de la poudre organique par la méthode Van Soest and Wine (%/MS)

Résidu NDF	61,7 ± 0,1
Extractible NDF	38,3 ± 0,1
Résidu ADF	51,0 ± 0,3
Extractible ADF	49,0 ± 0,3
Taux de cellulose	44,0 ± 0,4
Taux de Lignine	7,0 ± 0,4
Taux d'hémicelluloses	10,7 ± 0,4

La fraction pariétale de la poudre organique est composée majoritairement de cellulose mais aussi des hémicelluloses et de lignine respectivement à hauteur de 17 % et 11 % (Figure II.18).

Au même titre que la chènevotte, la poudre organique peut être considérée comme une source intéressante de composés phénoliques.

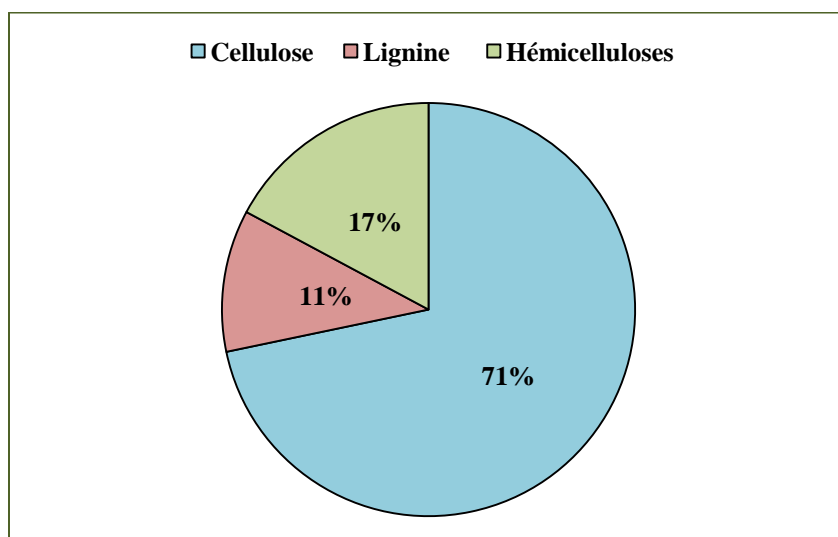


Figure II.18 : Répartition de la lignine, cellulose et hémicelluloses dans la fraction pariétale. Cas de la poudre organique

c. Les composants minoritaires

La poudre organique est riche en constituants non fibreux (38,3 %) qui sont entraînés et solubilisés dans les extractibles NDF. Cette valeur est cohérente puisque la poudre organique correspond pour partie aux liants végétaux (ex : pectine, ...) qui assuraient la cohésion de la tige et pour partie aux particules de fibre et de chènevotte issues du défibrage.

La somme des teneurs en protéines, pectines, cires et corps gras et minéraux dans MS de la poudre organique est de 26,6 % (Tableau II.17). La teneur en extractibles non pariétaux étant de 38,3 %, on constate que d'autres extractibles, supplémentaires à ceux analysés dans notre étude,

semblent alors être présents. Les composés phénoliques constituent une fraction de ces extractibles.

Tableau II.17 : Teneurs en protéines, pectines et cires et corps gras dans la poudre organique

Composants minoritaires	%/MS	%/MO
Protéines	8,4 ± 0,1	9,7 ± 0,1
Pectines (équivalent acide galacturonique)	4,3 ± 0,2	4,9 ± 0,3
Cires et corps gras	0,6	0,7
Minéraux	13,2	
Total	26,6	

II.1.2.4. Extraction et analyse de la fraction phénolique

Les protocoles employés pour l'analyse des composés phénoliques dans la poudre organique sont les mêmes que ceux appliqués précédemment pour la chènevotte.

Les rendements en composés extractibles, obtenus par extraction au Fibertec, sont exposés dans le Tableau II.18 et la Figure II.19. Les composés non pariétaux ont une affinité maximale pour le solvant le plus polaire. On trouve alors, dans l'eau, 19,8 % d'extractibles/MO_i (198 mg/g MO_i) dont 19,3 % de minéraux ce qui est équivalent à 3,4 % de minéraux par rapport à la MS_i.

L'extraction aqueuse conduit à des rendements d'extraction de 45 % des extractibles NDF. 37 % des extractibles à l'eau sont insolubles dans l'éthanol 60 % (v/v) et 64 % sont insolubles dans l'éthanol 95 % (v/v). Le solvant hydro-alcoolique conduit à un rendement intermédiaire.

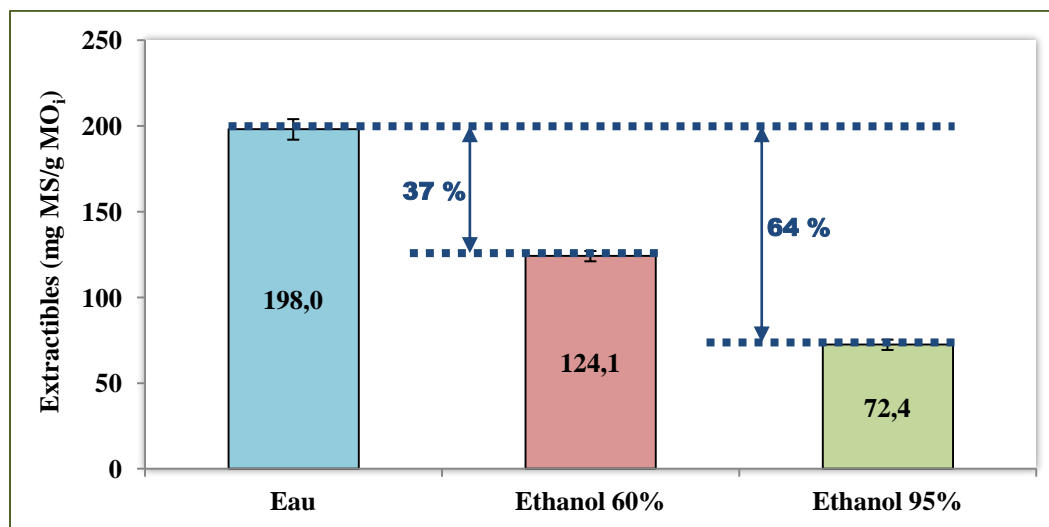


Figure II.19 : Rendements en extractibles Fibertec (L/S=100, reflux, 1h). Cas de la poudre organique

Tableau II.18 : Rendements en extractibles Fibertec de la poudre organique ($n = 3$)

Solvant	Extractibles (rendements)				
	mg MS/g MS _i	mg MS/g MO _i	mg MO/g MO _i	%MM/%MS _E	%MM/MS _i
Eau	172 ± 5	198 ± 6	163	19,3	3,4
Ethanol 60 %	108 ± 3	124 ± 3	113	8,2	0,9
Ethanol 95 %	63 ± 3	72 ± 3	72 ± 3	0	0

Les rendements en polyphénols dans les extraits sont exprimés en mg d'Equivalent Acide Gallique (EAG) par g de MO_i (Figure II.20 et Tableau II.19). La teneur en polyphénols est aussi représentée par rapport à la matière organique extraite.

L'efficacité d'extraction de l'eau et celle de l'éthanol 60 % sont comparables. Les deux solvants permettent d'extraire environ 8 mg de composés phénoliques/g de MO_i.

De plus, la composition en polyphénols des fractions extraites atteint un maximum de 7,7 % pour le solvant hydro-alcoolique qui est alors le plus sélectif.

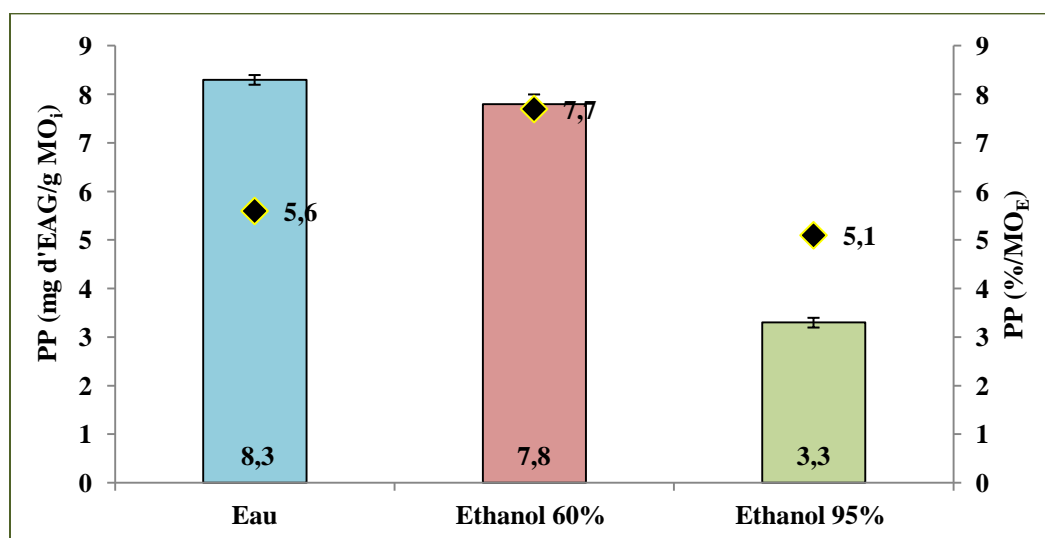


Figure II.20 : Rendements d'extraction en composés phénoliques totaux et teneurs en composés phénoliques des fractions extraites (♦). Cas de la poudre organique

Tableau II.19 : Rendements et teneurs en polyphénols totaux des extraits. Cas de la poudre organique

Solvant	PP (rendements)		PP (teneurs)	
	mg/g MS _i	mg/g MO _i	%/MS _E	%/MO _E
Eau	8,1 ± 0,1	8,3 ± 0,1	4,8±0,2	5,6 ± 0,6
Ethanol 60 %	7,6 ± 0,2	7,8 ± 0,2	7,2±0,3	7,7 ± 0,6
Ethanol 95 %	3,2 ± 0,1	3,3 ± 0,1	5,1±0,3	5,1 ± 0,3

Parmi les composés phénoliques totaux, deux acides phénoliques ont été analysés et quantifiés : l'acide *p*-coumarique et l'acide férulique (Figure II.21). Leurs rendements étant faibles, il est possible de conclure que ces acides sont peu présents sous forme libre dans la poudre organique. L'extractabilité de l'AF n'est pas comparable à celle de l'ApC. Elle est maximale dans l'extrait hydro-alcoolique et minimale dans l'extrait à l'éthanol dans les cas de l'AF, tandis qu'elle est similaire dans les extraits aqueux et hydro-alcoolique dans le cas de l'ApC. Le cas de l'ApC est comparable à celui des polyphénols totaux.

Les rendements d'extraction en ApC sont supérieurs aux rendements en AF. Le ratio ApC/AF calculé pour tous les solvants est compris entre 2 et 8. Le ratio de 8 ayant été déterminé pour l'éthanol 95 %, ce dernier est alors plus sélectif de l'ApC que de l'AF.

Notons que la vanilline a été aussi identifiée et quantifiée et que son rendement d'extraction est négligeable ($< 3 \mu\text{g/g}$ de la MO_i).

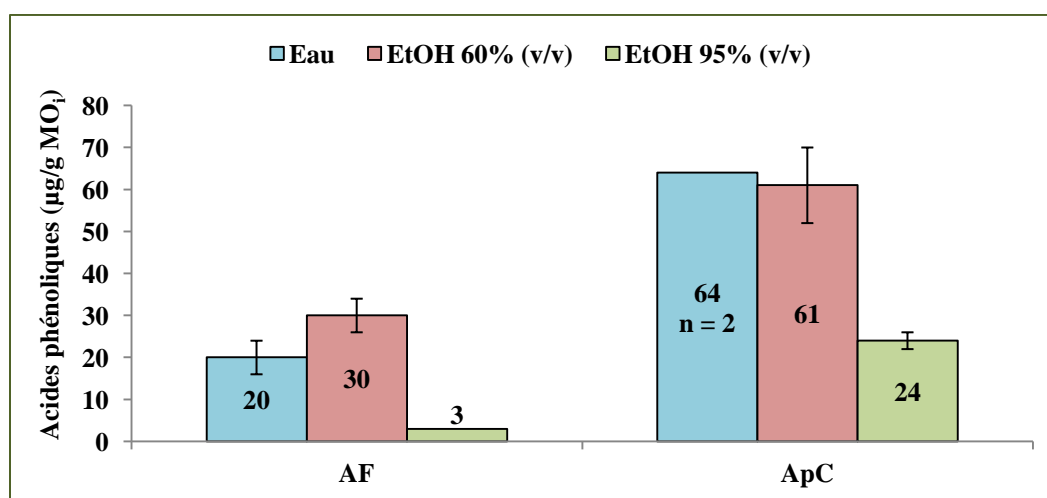


Figure II.21 : Rendements d'extraction en acides phénoliques en fonction du solvant. Cas de la poudre organique ($n = 3$)

Les dernières données sur les acides phénoliques sont représentées par rapport à la matière sèche ou organique extraite et par rapport aux taux des composés phénoliques extraits (Tableau II.20). Une sélectivité maximale est observée pour le solvant hydro-alcoolique pour les deux acides étudiés.

Tableau II.20 : Rendements d'extraction en acides férulique et *p*-coumarique. Cas de la poudre organique

Rendements d'extraction des acides phénoliques dans la poudre organique exprimés en					
Solvant	$\mu\text{g/g MO}_E$		$\mu\text{g/g PP}$		Ratio ApC/AF
	AF	ApC	AF	ApC	
Eau	140 \pm 20	400 *	2600 \pm 300	6700 *	3
Ethanol 60 %	200 \pm 40	500 \pm 90	2800 \pm 500	6800 \pm 1100	2
Ethanol 95 %	50 \pm 20	300 \pm 50	1100 *	6400 \pm 800	8

* : Moyenne sur deux extraits analysés et pas sur trois extraits comme pour le reste des valeurs

La poudre organique contient 0,3 % d'acide férulique et 0,7 % d'acide *p*-coumarique solubles dans l'éthanol 60 % par rapport à la totalité des composés phénoliques, ce qui équivaut respectivement à 0,02 % et 0,1 % de la totalité de la matière organique extractible.

Ces rendements sont plus faibles dans le cas de l'extrait aqueux et encore plus faibles dans le cas de l'éthanol.

Même si les extraits de la poudre organique sont plus riches en polyphénols totaux comparativement à la chènevotte, ils sont caractérisés par des teneurs inférieures en AF et ApC.

II.2. Extraction des acides hydroxycinnamiques des coproduits du chanvre

Les matières premières étudiées présentent de faibles teneurs en acides phénoliques libres. D'autres méthodes d'extractions utilisant les mêmes solvants mais des conditions opératoires plus drastiques ont été appliquées pour envisager d'améliorer les rendements d'extraction.

Une étude complémentaire a aussi été menée afin de libérer les acides phénoliques liés à la matière végétale par des liaisons esters ou éthers. Pour cela, un recours à des conditions d'hydrolyse alcalines a été envisagé.

Les quatre méthodes d'extraction étudiées ont été (Tableau II.21) :

- La macération : extraction en batch, sous agitation, à température ambiante, pour une durée de 24 h avec un ratio L/S élevé, ici fixé à 16. Ce procédé permet d'extraire par immersion prolongée les composés solubles (Owen *et al.* 2003 ; Y. Sun *et al.* 2006 ; Vellingiri, Amendola, et Spigno 2014).
- Soxhlet : extraction des composés recherchés par percolation pour un ratio L/S de 12. L'extrait est récupéré après un nombre de cycles déterminé ou une durée suffisante pour théoriquement épuiser complètement la matière à extraire. Notre étude était effectuée

pendant une durée d'extraction de 6 heures, considérée suffisante selon la littérature pour extraire les composés phénoliques (Guo *et al.* 2003 ; Owen *et al.* 2003).

- Accelerated Solvent Extraction (ASE) : extraction utilisant les effets combinés de la température et de la pression. Comparée aux extractions effectuées à température ambiante et à pression atmosphérique, l'extraction ASE permet d'augmenter l'efficacité d'extraction, d'une part par l'amélioration du transfert de la matière vers le solvant et l'augmentation de sa solubilité (Blasco et Picó 2009), et d'autre part par l'amélioration de la diffusion du solvant dans la matrice, tout en utilisant des solvants classiques. Ainsi par comparaison à l'extraction par solvant, les temps d'extraction sont plus courts et l'utilisation de solvants est réduite (Buranov et Mazza 2009 ; Xie *et al.* 2009 ; Sarkar, Alvarez, et Saldaña 2014).

Cette technique, initialement nommée ASE (commercialisé sous ce nom par Dionex), est de nos jours, connue sous d'autres noms comme PFE (*Pressurized Fluid Extraction*), PHSE (*Pressurized Hot Solvent Extraction*), HPSE (*High-Pressure Solvent Extraction*), SSE (*Subcritical Solvent Extraction*) et PLE (*Pressurized Liquid Extraction*). Cette dernière nomination est celle la plus utilisée par les auteurs et les éditeurs (Blasco et Picó 2009).

Dans notre étude, l'extraction a été effectuée à 50 °C pour l'éthanol et 80 °C pour l'eau, à une pression de 100 bars. Avec 3 cycles statiques, la durée totale de l'extraction est de 26 min. Les ratios L/S totaux étaient de 12,5 pour la chènevotte et de 10 pour la poussière.

- Hydrolyse alcaline en batch : cette extraction dans des conditions sévères a été réalisée afin de déterminer le potentiel en composés phénoliques de chaque coproduit : L/S = 30, [NaOH] = 4 M, 24 h et 20 °C. Selon la littérature, ces conditions permettent d'extraire le maximum de composés phénoliques totaux présents (Sun *et al.* 2002 ; Culhaoglu *et al.* 2011 ; Hao et Beta 2012 ; Wang *et al.* 2013) qu'ils soient sous forme libre ou liée.

Afin de définir le ratio L/S et la concentration en hydroxyde de sodium, des essais préliminaires ont été réalisés sur un premier lot de chènevotte. Ces essais ont conduit au choix des conditions opératoires suivantes : L/S = 30 mL/g et [NaOH] = 4 M.

Tableau II.21 : Conditions opératoires mises en œuvres pour les extractions des coproduits du chanvre

Conditions opératoires						
Méthode d'extraction	Solvant	Réactif	Ratio L/S	Durée	Température	Pression
Macération	Eau	Non	16	24 h	Ambiante	1 bar
	Ethanol 60 %					
	Ethanol 95 %					
Soxhlet	Eau	Non	12	6 h	Reflux	1 bar
	Ethanol 60 %					
	Ethanol 95 %					
ASE	Eau	Non	12,5 (CH) 10 (P)	0,5 h	50 °C-Ethanol 80 °C -Eau	100 bars
	Ethanol 60 %					
	Ethanol 95 %					
Hydrolyse alcaline	Eau	NaOH (4 M)	30	24 h	20 °C	1 bar

CH : Chènevotte ; P : Poudre organique

II.2.1. La chènevotte

II.2.1.1. Extraction analytique sans hydrolyse chimique

Le rendement en composés extractibles a été déterminé pour chaque méthode d'extraction (Figure II.22 et Tableau II.22). A titre comparatif, les valeurs obtenues lors des extractions Fibertec (Partie II.1.1.4) ont été reportées dans les figures.

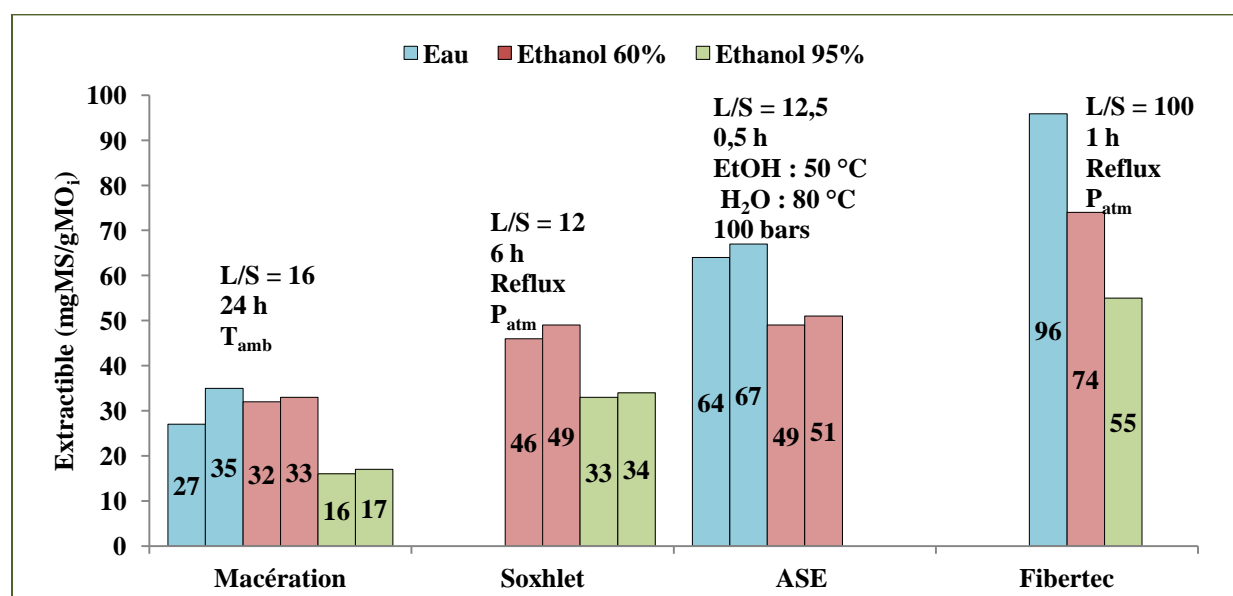


Figure II.22 : Rendements en extractibles obtenus en macération, Soxhlet, ASE et Fibertec. Cas de la chènevotte

Tableau II.22 : Rendements en extractibles en fonction du solvant et de la méthode d'extraction. Cas de la chènevotte

Solvant	Macération		Soxhlet		ASE
	mgMS/gMS _i	mgMO/gMO _i	mgMS/gMS _i	mgMO/gMO _i	mgMS/gMS _i
Eau	30	19	Nd	Nd	64
Ethanol 60 % (v/v)	32	26	46	41	49
Ethanol 95 % (v/v)	16	15	32	30	8

Nd : Non déterminé

Pour la macération, les rendements moyens en extractibles dans l'eau, l'éthanol 60 % et l'éthanol 95 % sont respectivement de 31, 33 et 17 mg de matière sèche extraite par 1g de matière organique initiale. Les efficacités d'extraction de l'eau ou du mélange hydro-alcoolique sont équivalentes tandis que l'éthanol présente une efficacité bien inférieure. Ces valeurs (L/S = 16, 20 C, 24 h) représentent 30 à 45 % des valeurs considérées comme les potentiels analytiques et obtenues par extraction en Fibertec (L/S = 100, sous reflux, 1 h). Ces résultats mettent en évidence l'effet de la température ainsi que celui du rapport L/S sur le rendement en extractibles. Les valeurs obtenues lors de notre étude en macération peuvent être comparées avec les résultats des travaux de Bag et al. (L/S = 27, 20 °C, 6 h). Ce dernier a évalué les rendements d'extraction à 25 et 6 mg/gMS_i par extraction aqueuse et éthanolique

Concernant l'extraction Soxhlet, les rendements en extractibles de 48 et 34 mg MS/gMO_i pour le solvant hydro-alcoolique ou l'éthanol 95 % sont légèrement supérieurs à ceux mesurés par macération. Cette comparaison met en évidence un léger effet positif de l'augmentation de la température. Par contre, réalisée pour L/S = 12, en percolation, sous reflux et pendant 6 heures, l'extraction en Soxhlet conduit à un rendement de 60-65 % par rapport au potentiel analytique Fibertec. Ceci peut s'expliquer par la température légèrement inférieure à la température d'ébullition du solvant, mais surtout par la surface de contact entre la chènevotte et le solvant qui est inférieure en Soxhlet. En effet, lors des extractions Fibertec, le ratio L/S = 100 et l'ébullition conduisent à l'hypothèse d'une dispersion infinie de la matière première dans le solvant.

Nos résultats (L/S = 12, 6 h) et ceux de Bag *et al.* (L/S = 27 ; 6 h) obtenus par extraction Soxhlet à l'éthanol 95 % diffèrent légèrement : 32 mg/gMS_i contre 22 mg/gMS_i. Le ratio L/S ayant peu d'effet, cette différence peut provenir de la variété du chanvre étudié et de son origine.

Les rendements d'extraction ASE sont comparables à ceux obtenus en Soxhlet pour l'éthanol 60 %. Cette valeur met en évidence l'effet positif de la pression sur le rendement en extractibles puisque la température et la durée étaient inférieures en ASE.

De plus, en ASE, l'eau apparaît comme le solvant le plus efficace ce qui est cohérent avec l'extraction Fibertec. Elle permet d'extraire 66 mg d'extractibles par rapport à la matière organique initiale. Ce rendement est le plus élevé et il représente 69 % du potentiel extrait à l'eau en Fibertec. Bien qu'il soit raisonnable de penser que la matière végétale se décompose sous haute pression, ce qui entraîne des tailles de particules réduites et donc une amélioration de libération des extractibles, il a aussi été démontré que la facilité pour un transfert de masse de la matière extraite vers le solvant dépendait de la température d'extraction (Lee et Lin 2007). Dans notre étude, le rendement en extractibles en ASE inférieur à celui obtenu en Fibertec peut être alors expliqué par une température d'extraction qui n'était pas assez élevée.

Les essais réalisés avec ces 3 techniques nous ont permis de conclure quant aux influences légèrement positives des paramètres température, ratio liquide/solide et pression sur le rendement en extractibles.

La Figure II.23 représente, en mg d'Equivalent Acide Gallique (EAG)/gMO_i, les rendements d'extraction en composés phénoliques totaux dans les extraits précédents.

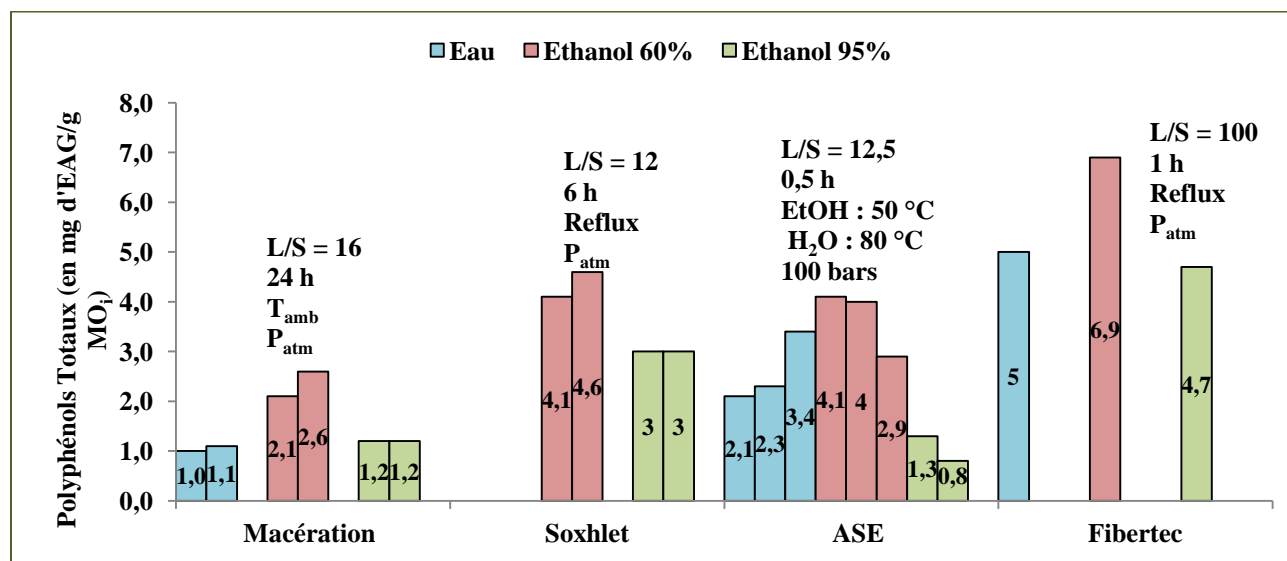


Figure II.23 : Rendements d'extraction en polyphénols totaux obtenus par macération, Soxhlet, ASE et Fibertec. Cas de la chènevotte

Quelle que soit la méthode d'extraction, l'éthanol 60 % est le solvant le plus efficace pour l'extraction des composés phénoliques. Ce résultat rejoint celui obtenu dans la partie II.1.1.4 par extraction Fibertec. Le solvant est donc le paramètre principal pour une amélioration de l'efficacité d'extraction des composés phénoliques. Le rendement maximal de 4,4 mg/g MO_i est

observé en Soxhlet avec le solvant hydro-alcoolique. Cette valeur représente 62 % du potentiel en composés phénoliques (Fibertec, II.1.1.4).

Pour les macérations aqueuse et éthanolique, les rendements en polyphénols sont voisins (1,1 et 1,2 mg d'EAG/g de MO_i). Calculés par rapport à la totalité des composés extraits, ces rendements montrent que l'éthanol 95 % (7 %) est plus sélectif que l'eau (3,5 %) pour l'extraction de ce type de molécules. Par contre, le ratio PP/extractibles avec l'éthanol 95 % est comparable à celui obtenu par extraction à l'éthanol 60 %.

Pour l'extraction en Soxhlet et par comparaison avec la macération, la température semble avoir un effet significatif sur le rendement en composés phénoliques totaux extraits. Des rendements de 4,4 et 3,0 mg d'EAG/g de MO_i obtenus pour l'éthanol 60 % et l'éthanol 95 % respectivement, correspondent à des extraits dont les teneurs en composés phénoliques par rapport à la matière organique extraite sont équivalentes (9%).

Pour l'extraction ASE à l'éthanol 60 %, le ratio PP/extractibles est égal à 7 % ce qui est comparable au ratio obtenu en macération. Donc ces deux méthodes semblent conduire à des sélectivités équivalentes

L'extraction des composés phénoliques totaux augmente avec la température, ce qui est cohérent avec le résultat de l'étude effectuée par Kim et Mazza 2006. De plus, le rapport liquide/solide semble avoir un effet positif sur l'extractibilité. Sans oublier que l'éthanol 60 % est le solvant le plus sélectif.

Les rendements d'extraction en acides phénoliques et en vanilline Van sont représentés dans le Tableau II.23.

Tableau II.23 : Rendements d'extraction en composés phénoliques (µg/g MO_i) obtenus par macération, Soxhlet, ASE en duplicat et par Fibertec. Cas de la chènevotte

Méthodes d'extraction	Acide férulique			Acide <i>p</i> -coumarique			Vanilline			Ratio ApC/AF		
	Eau	Ethanol 60 %	Ethanol 95 %	Eau	Ethanol 60 %	Ethanol 95 %	Eau	Ethanol 60 %	Ethanol 95 %	Eau	Ethanol 60 %	Ethanol 95 %
Macération	3	5	3	15	54	68	n.d.	27	13	5	11	23
Soxhlet	*	26	7	*	507	135	*	21	22	*	20	19
ASE	0	11	5	10	80	46	5	17	7	10	7	9
Fibertec	80	30	8	475	207	97	<5	<5	<5	6	7	12

(n.d. : non détecté ; * : manipulation non faite)

Les acides phénoliques et la vanilline sont extraits en suivant les mêmes tendances que les composés phénoliques totaux, avec des rendements maximaux pour une extraction à l'éthanol 60 %. Les rendements en ApC sont dans tous les cas bien supérieurs aux rendements en AF. Un

facteur 5 à 23 a été calculé pour le ratio ApC/AF en fonction de la méthode d'extraction et du solvant.

Les rendements sont les plus élevés dans le cas de l'extraction en Soxhlet. Dans le cas de l' ApC , ils dépassent par extraction à l'éthanol 60 % (507 $\mu g/g$ de MO_i) et l'éthanol 95 % (135 $\mu g/g$ de MO_i), les potentiels (207 et 97 $\mu g/g$ de MO_i) obtenus par Fibertec (partie II.1.1.4). Cela peut être expliqué par la saturation du solvant d'extraction en Fibertec alors qu'il est renouvelé pour chaque cycle en Soxhlet.

Dans la littérature, plusieurs études ont été menées sur l'extraction des acides phénoliques à partir de la matière végétale. Une des plantes les plus étudiées est une plante médicinale : l'angélique (*Angelica sinensis*), qui est caractérisée par une teneur élevée en acide férulique libre et lié. Les rendements d'extraction de l'acide férulique dans cette plante ont été déterminés par extraction à reflux et en utilisant comme solvants : l'eau, l'éthanol 50 % et l'éthanol (Tableau II.24). L'efficacité d'un solvant hydro-alcoolique pour l'extraction des composés phénoliques (Sheu *et al.* 1987 ; Lu *et al.* 2005) est aussi observée pour cette matière première. Remarquons que les rendements d'extraction pour l'Angélique sont bien supérieurs à ceux observés pour la chènevotte. Les acides phénoliques et la vanilline sont ainsi présents en faibles quantités à l'état libre dans la chènevotte.

Tableau II.24 : Rendements d'extraction de l'acide férulique par extraction à reflux de l'angélique (Sheu *et al.* 1987 ; Lu *et al.* 2005)

Solvant d'extraction	Rendement en acide férulique exprimé en $\mu g/g$
Eau	420
Ethanol 50 %	580 – 610
Ethanol	470

L'amélioration des rendements d'extraction en composés phénoliques passe donc par la libération des acides phénoliques liés à la structure végétale c'est-à-dire par une hydrolyse chimique des liaisons.

II.2.1.2. Hydrolyse alcaline en batch

L'hydrolyse alcaline a pour but d'hydrolyser les liaisons dans la structure lignocellulosique, mais aussi de rendre les composés phénoliques plus accessibles au solvant d'extraction. En plus de l'hydrolyse des liaisons esters entre polysaccharides et acides hydroxycinnamiques et la solubilisation des hémicelluloses, l'addition d'une base dans des conditions dures, conduit à

l'extraction des composés liés par des liaisons éthers à la paroi végétale (Wang *et al.* 2013) et à la dépolymérisation et la solubilisation de la lignine (Wang, Sain, et Oksman 2007). L'utilisation de la soude avec une concentration de 4 M doit ainsi permettre d'extraire le maximum de composés phénoliques totaux présents dans la chènevotte (Sun *et al.* 2002). Selon Tilay *et al.* 2008, l'interaction entre la durée de l'extraction et la concentration en NaOH affecte l'efficacité de l'extraction. Les conditions optimales pour l'extraction de l'AF sont : NaOH 4 M, 21,6°C et 24 h. Ces conditions sont similaires à celles que nous avons appliquées.

Le rendement en extractibles dans ces conditions a été évalué à 836 ± 46 mgMO/gMO_i. Il est 40 fois supérieur au rendement de macération en batch sans agent alcalin. Ceci suggère une hydrolyse des composés sans aucune augmentation de la température.

Ce rendement est aussi 10 fois supérieur au potentiel en extractibles obtenu à 100°C en Fibertec (82,0 mgMO_E/MO_i) ce qui confirme l'effet positif majeur de l'ajout d'un réactif sur l'extraction.

Le rendement maximal d'extraction en composés phénoliques totaux est de 12,6 mg d'EAG/g de MO_i (Figure II.24). Ce rendement représente plus du double de celui obtenu en Fibertec pour un solvant aqueux (5,0 mg d'EAG/g MO_i). L'utilisation de NaOH conduit à la rupture de liaisons chimiques entre les composés phénoliques et la structure lignocellulosique. .

Parmi les PP analysés, l'ApC est le plus abondant, suivi par l'AF puis par la Van (Figure II.19). Les rendements pour les deux acides phénoliques en hydrolyse alcaline suivent la même tendance qu'en macération sans réactifs à une température identique et qu'en Fibertec (100 °C), bien qu'ils soient bien supérieurs en valeur absolue. Le rendement en ApC est multiplié par un facteur de 236 par rapport à celui évalué en macération et par un facteur 8 par rapport à celui mesuré en Fibertec. Le rendement en AF est 100 fois supérieur à celui obtenu en macération et 4 fois supérieur à celui obtenu en Fibertec. La chènevotte contient ainsi beaucoup plus d'acides phénoliques liés à la paroi végétale que d'acides phénoliques libres.

Un facteur 12 a été calculé pour le ratio ApC/AF en hydrolyse alcaline. Cette technique d'extraction étant connue pour libérer l'intégralité des acides phénoliques, il est possible de conclure que le potentiel en AF de la chènevotte est inférieur au potentiel en ApC. Cela reflète que la chènevotte contient plus d'ApC que d'AF liés.

Le rendement en AF est comparable à celui trouvé dans les anas de lin et il est supérieur à celui déterminé dans la paille de lin (Tableau II.25). Quant au rendement en ApC, il est supérieur à

celui mesuré dans le son de blé, les anas et la paille de lin. A noter que concernant les résultats présentés par Bauer, Harbaum-Piayda, et Schwarz 2012, aucune variation n'a été détectée pour une concentration plus élevée en soude ou pour une durée d'extraction plus longue. Enfin la chènevotte contient une faible quantité de vanilline.

Donc la chènevotte peut être considérée une matière végétale riche en composés phénoliques et surtout en ApC.

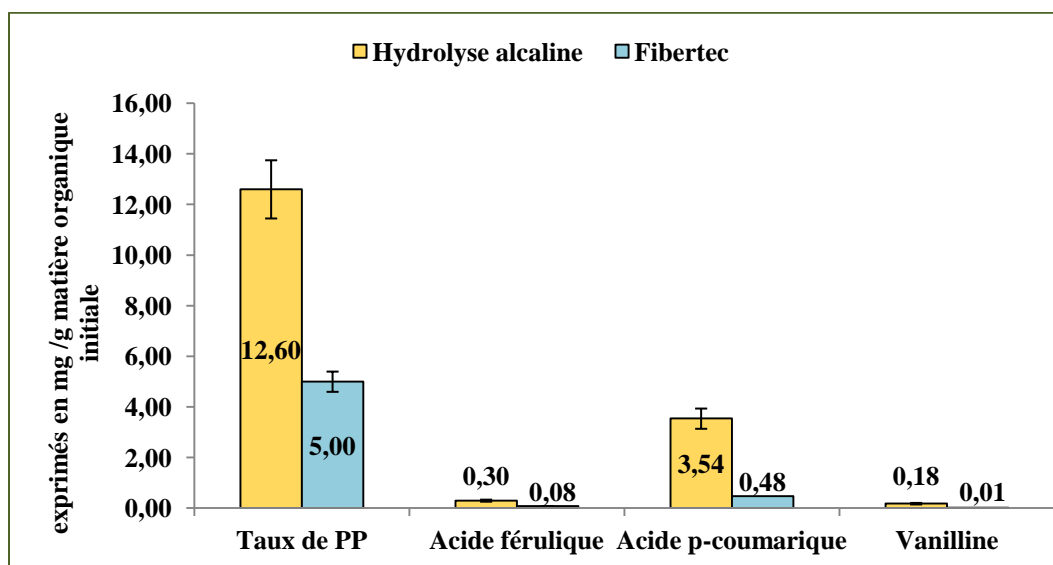


Figure II.24 : Rendements d'extraction en composés phénoliques obtenus par hydrolyse alcaline et par extraction Fibertec à l'eau. Cas de la chènevotte

Tableau II.25 : Comparaison des rendements d'extraction en composés phénoliques dans diverses matières végétales

Matière végétale	Conditions expérimentales	Acide férulique (mg/g)	Acide p-coumarique (mg/g)	Vanilline (mg/g)	Référence
Son de blé	NaOH 4 M, 24 h, atm N ₂	3,0 ± 0,04	0,1 ± 0,01	Nd	Bauer, Harbaum-Piayda, et Schwarz 2012
Son de blé	NaOH 0,5 M, 50 °C, 4 h, L/S = 30	3,9 ± 0,5	0,2 ± 0,05	0,11 ± 0,02	Buranov et Mazza 2009
Anas de lin	NaOH 0,5 M, 50 °C, 4 h, L/S = 30	0,3 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,48 ± 0,03	Buranov et Mazza 2009
Paille de lin	NaOH 4 M, 110 °C, 2 h	0,1	0,1	0,4	Tapin <i>et al.</i> 2006

Nd : non déterminé

II.2.2. La poudre organique

Les méthodes d'extraction expérimentées sur la chènevotte ont été aussi appliquées à la poudre organique. L'efficacité de chacune des méthodes sur l'extraction des composés phénoliques a été étudiée.

II.2.2.1. Extractions analytiques sans hydrolyse chimique

Le rendement en composés extractibles a été déterminé pour chacune des méthodes d'extraction (Figure II.25 et Tableau II.26).

En fonction des solvants d'extraction, la tendance d'extractibilité est comparable pour chacune des méthodes utilisées. L'eau est le solvant le plus efficace suivi par l'éthanol 60 % et l'éthanol 95 %.

Pour la macération, les rendements en extractibles dans l'eau, l'éthanol 60 % et l'éthanol 95 % sont respectivement de 87, 70 et 20 mg MS_E/gMO_i. Ces valeurs (L/S = 16, 20 °C, 24 h) représentent 28-57 % des valeurs Fibertec considérées comme potentiels analytiques (L/S = 100, reflux, 1 h). Ces résultats mettent en évidence, comme dans le cas de chènevotte, l'effet positif de la température ainsi que celui du ratio L/S. Augmenter la température et/ou le ratio L/S aboutit à solubiliser 2 fois plus d'extractibles dans le cas de l'eau et du solvant hydro-alcoolique et 4 fois plus dans le cas de l'éthanol.

Les rendements obtenus par extraction Soxhlet sont supérieurs à ceux de la macération. Cette différence montre l'effet de la température sur le rendement. Par extraction Fibertec, la température légèrement supérieure et la plus grande surface de contact (L/S = 100) améliorent de 26-31 % les rendements d'extraction obtenus en Soxhlet (reflux, L/S = 12).

Les rendements d'extraction ASE à l'éthanol 60 % sont comparables à ceux obtenus en Soxhlet. Ces valeurs mettent en évidence l'effet de la pression sur le rendement en extractibles puisque la température et la durée d'extraction sont inférieures en ASE. Le rendement en extractibles avec l'eau comme solvant est plus élevé (136 mg MS/gMO_i) que celui mesuré en macération, mais reste inférieur au potentiel de 198 mg MS/gMO_i (voir partie II.1.2.3.a). Comme dans le cas de la chènevotte, il représente 69 % du potentiel en extractibles.

La température, le ratio liquide/solide et la pression ont donc un effet positif sur le rendement en extractibles de la poudre organique qui est jusqu'à 2 fois plus riche en extractibles que la chènevotte.

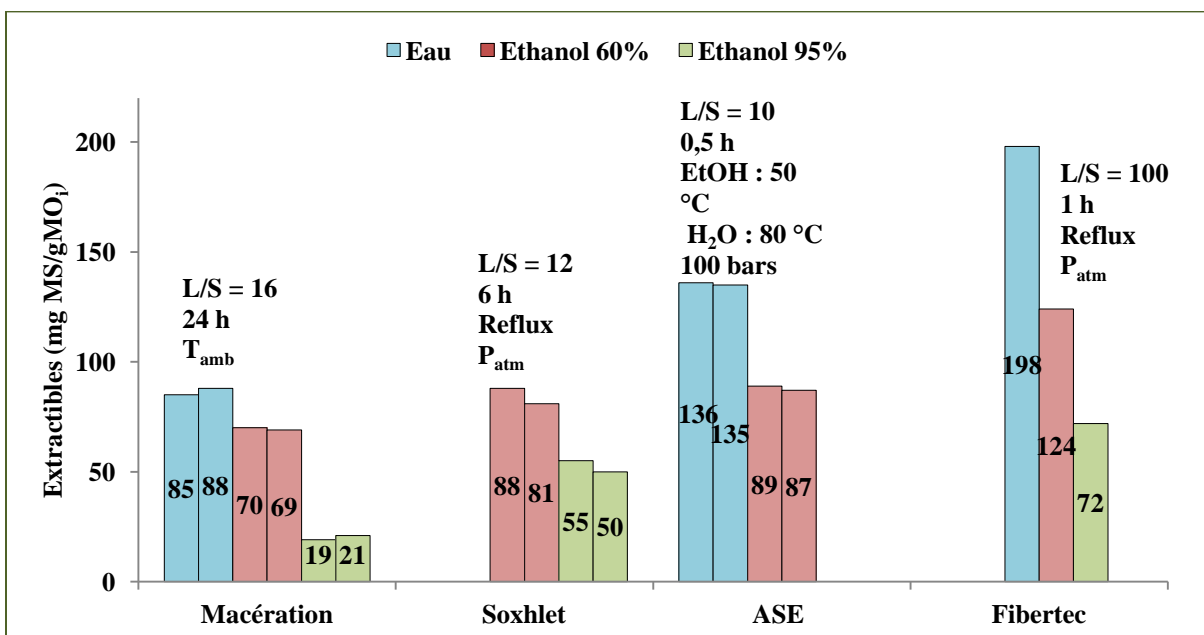


Figure II.25 : Rendements en extractibles obtenus en macération, Soxhlet, ASE et Fibertec. Cas de la poudre organique

Tableau II.26 : Rendements en extractibles en fonction du solvant et de la méthode d'extraction. Cas de la poudre organique

	Macération		Soxhlet		ASE
Solvant	mgMS/gMS _i	mgMO/gMO _i	mgMS/gMS _i	mgMO/gMO _i	mgMS/gMS _i
Eau	75	78	Nd	Nd	118
Ethanol 60 % (v/v)	60	56	73	70	76
Ethanol 95 % (v/v)	17	19	46	49	8

Nd : Non déterminé

La Figure II.26 représente, en mg d'EAG/gMO_i, les rendements d'extraction en composés phénoliques totaux.

Parmi les solvants étudiés, le solvant hydro-alcoolique présente l'efficacité d'extraction en composés phénoliques la plus élevée indépendamment de la méthode utilisée.

Le rendement maximal de 6,7 mg d'EAG/gMO_i est obtenu en Soxhlet avec l'éthanol 60 %. Il représente 86 % du potentiel en composés phénoliques (Fibertec).

Pour la macération, le rendement en composés phénoliques avec l'éthanol 60 % représente 7 % de la totalité des extractibles. Ce rendement est inférieur à celui observé en Soxhlet, ce qui montre l'effet positif de la température sur l'extractibilité des PP.

En extraction ASE, l'efficacité de l'éthanol 60 % est légèrement supérieure à celle de l'eau. Par contre, pour un même solvant, le rendement par extraction ASE est bien supérieur à celui de la macération pour une extraction aqueuse alors qu'ils sont voisins pour une extraction hydro-

alcoolique. Un effet positif de la pression sur l'extractabilité des PP est donc observé dans le cas du solvant aqueux.

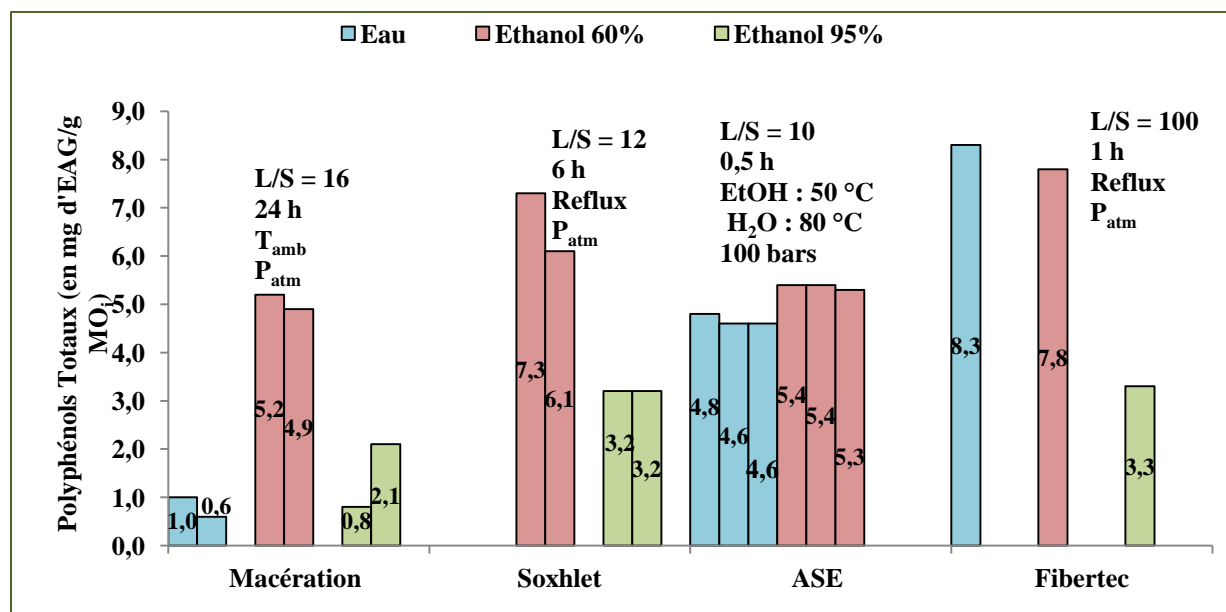


Figure II.26 : Rendements d'extraction en polyphénols obtenus par macération, Soxhlet, ASE et fibertec. Cas de la poudre organique

Concernant l'extraction des acides phénoliques et de la vanilline (Tableau II.27), les mêmes tendances que celles observées dans le cas des PP ont pu être notées. Une fois de plus, il semble que l'éthanol 60 % soit le solvant le plus efficace.

Le ratio ApC/AF de 1-10 calculé montre que la poudre organique est plus riche en ApC libre.

Les rendements en acides phénoliques sont les plus élevés dans le cas de l'extraction en Soxhlet. Ils dépassent, dans le cas de l'ApC, par extraction avec l'éthanol 60 % (202 µg/g MO_i) et l'éthanol 95 % (49 µg/g MO_i), le potentiel extrait en Fibertec (61 et 24 µg/g MO_i). Donc le Soxhlet permet d'améliorer l'extractabilité des composés phénoliques puisque, contrairement au Fibertec et à la macération, le solvant d'extraction n'atteint pas la saturation en composés phénoliques.

Tableau II.27 : Rendements d'extraction en composés phénoliques (µg/gMO_i) obtenus par macération, Soxhlet, ASE en duplicat et par Fibertec. Cas de la poudre organique

Méthodes d'extraction	Acide férulique			Acide p-coumarique			Vanilline			Ratio ApC/AF		
	Eau	Ethanol 60 %	Ethanol 95 %	Eau	Ethanol 60 %	Ethanol 95 %	Eau	Ethanol 60 %	Ethanol 95 %	Eau	Ethanol 60 %	Ethanol 95 %
Macération	0	7	2	n.d.	17	16	n.d.	7	5	-	2	8
Soxhlet	*	21	5	*	202	49	*	15	18	*	10	10
ASE	0	25	0	0	29	1	15	21	n.d.	-	1	-
Fibertec	20	30	3	64	61	24	<3	<3	<3	3	2	8

(n.d. : non détecté ; * : manipulation non faite)

Bien que la poudre organique soit plus riche en composés phénoliques libres que la chènevotte, les quantités déterminées jusqu'alors ne sont pas représentatives de la quantité optimale pouvant être extraite de la matière végétale. Des extractions par hydrolyse alcaline ont donc été réalisées.

II.2.2.2. Hydrolyse alcaline

Le rendement en extractibles après extraction alcaline est égal à 973 ± 16 mgMO/g MO_i. Ce rendement est 12 fois supérieur à celui mesuré par macération à l'eau. Travailler en milieu alcalin conduit à une amélioration importante du rendement en matière organique.

Les composés phénoliques ont été dosés en tant que polyphénols totaux ou sous forme individualisée AF et ApC (Figure II.27).

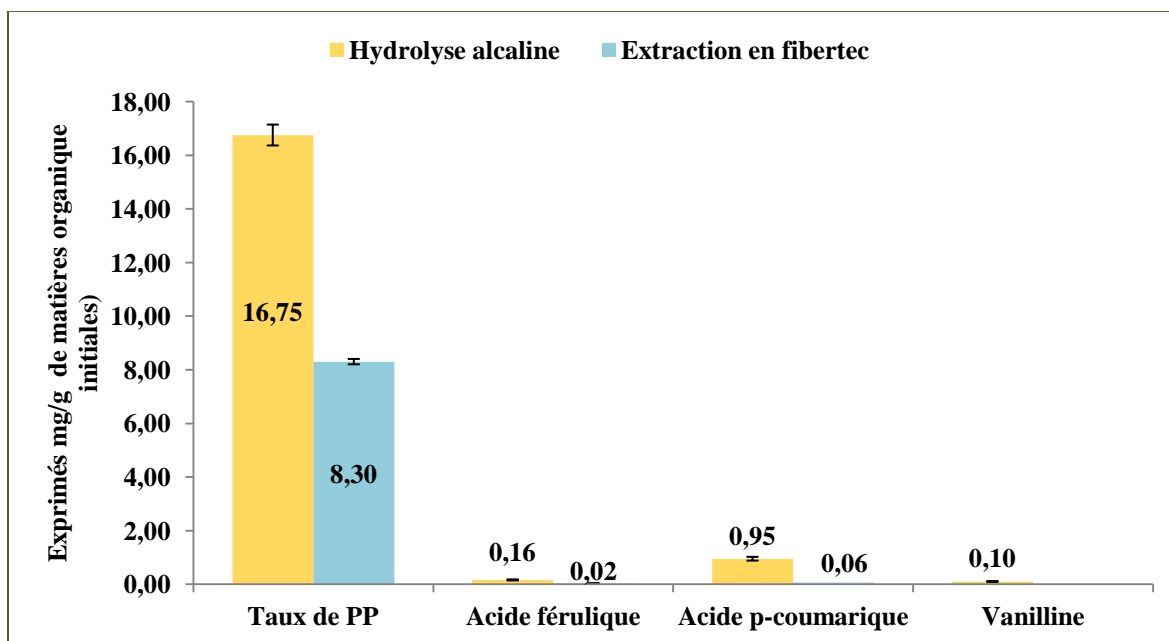


Figure II.27 : Rendements d'extraction en composés phénoliques obtenus par hydrolyse alcaline et par extraction Fibertec à l'eau. Cas de la poudre organique

Le rendement maximal d'extraction en composés phénoliques totaux est égal à 16,8 mg d'EAG/gMO_i, ce qui est bien supérieur au rendement de 0,8 mg d'EAG/gMO_i mesuré par macération dans l'eau. De surcroît, le rendement de référence (Fibertec) est 2 fois inférieur au rendement en conditions alcalines. L'action de la soude a augmenté l'extractabilité des PP et a permis de dépasser l'efficacité apportée par action de la température (Fibertec).

Parmi les PP analysés, on trouve au total, 0,95 mg/gMO_i d'ApC, 0,16 mg/gMO_i d'AF et 0,10 mg/gMO_i de Van dans la poudre organique. Par rapport à l'extraction aqueuse en Fibertec (100 °C), les rendements sont plus élevés d'un facteur de 15 pour l'ApC et de 8 pour l'AF. Cela montre que la poudre organique contient beaucoup plus d'acides phénoliques liés dans la paroi végétale que d'acides phénoliques libres.

Pour l'hydrolyse alcaline, le rendement en ApC est supérieur à celui en AF avec un facteur 6 pour le ratio ApC/AF. Comparé à un facteur 3 pour les potentiels en AF et ApC libres (Fibertec), il est ainsi prouvé que la paroi végétale de la poudre organique contient plus d'acide d'ApC liés que d'AF liés.

Tableau II.28 : Tableau récapitulatif des rendements d'extraction en composés phénoliques

Matière première	Méthode d'extraction	Conditions opératoires					Rendements d'extraction en composés phénoliques dans les extraits exprimés en µg/g MO _i											
							PP			AF			ApC			Van		
		L/S	Durée (h)	Temp-érature (°C)	Pression (Bar)	Réactif	Eau	EtOH 60%	EtOH 95%	Eau	EtOH 60%	EtOH 95%	Eau	EtOH 60%	EtOH 95%	Eau	EtOH 60%	EtOH 95%
Chênevotte	Fibertec	100	1	Reflux	1	-	5000	6900	4700	80	30	8	475	207	97	Trace	Trace	Trace
	Macération	16	24	20	1	-	1100	2400	1200	3	5	3	15	54	68	n.d.	27	13
	Soxhlet	12	6	Reflux	1	-	-	4400	3000	-	26	7	-	507	135	-	21	22
	ASE	12,5	0,5	80 (eau) 50 (éthanol)	100	-	2600	3700	1100	0	11	5	10	80	46	5	17	7
	Hydrolyse alcaline	30	24	20	1	NaOH 4M	12600	-	-	300	-	-	3540	-	-	180	-	-
Poudre organique	Fibertec	100	1	Reflux	1	-	8300	7800	3300	20	30	3	64	61	24	Trace	Trace	Trace
	Macération	16	24	20	1	-	800	5100	1500	0	7	2	n.d.	17	16	n.d.	7	5
	Soxhlet	12	6	Reflux	1	-	-	6700	3200	-	21	5	-	202	49	-	15	18
	ASE	10	0,5	80 (eau) 50 (éthanol)	100	-	4700	5400	600	0	25	0	0	29	1	15	21	n.d.
	Hydrolyse alcaline	30	24	20	1	NaOH 4M	16750	-	-	160	-	-	950	-	-	100	-	-

Dans la première partie de ce chapitre, les expériences réalisées afin d'extraire les composés phénoliques à partir de la chènevotte et de la poudre organique, ont montré :

- L'influence positive de la température, du ratio L/S ainsi que de la pression sur le rendement en extractibles qui sont majoritairement solubles dans un solvant aqueux.
- L'influence positive de la température sur l'extractibilité des composés phénoliques totaux.
- L'efficacité du solvant hydro-alcoolique sur l'extraction des composés phénoliques libres de la paroi cellulaire de la plante.
- Que l'addition d'un réactif alcalin a permis d'hydrolyser les composés insolubles et donc d'augmenter le rendement en extractibles totaux.
- Que ce même réactif alcalin permet d'augmenter les taux de composés phénoliques extraits et d'ainsi dépasser le potentiel en composés phénoliques libres.

II.3. Caractérisation des liaisons éther/ester dans les coproduits lignocellulosiques du chanvre

Dans la structure lignocellulosique de la paroi cellulaire d'un végétal, les acides phénoliques sont liés à la lignine par des liaisons ester et éther. Parmi ces acides, l'acide férulique (AF) et l'acide *p*-coumarique (ApC), sont liés respectivement aux polysaccharides par des liaisons ester et à la lignine par des liaisons éther et ester (Krygier, Sosulski, et Hogge 1982 ; Xu *et al.* 2005). Plusieurs études ont été menées afin de déterminer le potentiel en acides phénoliques de différentes matières végétales. Du fait de la diversité des composés phénoliques présents, les méthodes utilisées dépendent de la nature de la matrice extraite (fruits, graines, feuilles ou tiges) et des mesures appliquées, soit pour protéger les composés phénoliques en raison de leur sensibilité à l'oxydation et à l'hydrolyse, soit par leur isolement par extraction (Xu *et al.* 2005 ; Tilay *et al.* 2008).

Parmi les auteurs qui ont travaillé sur l'extraction des composés phénoliques, Pan *et al.*, ont déterminé les teneurs en AF et ApC dans la paille de blé dans le but d'améliorer la qualité des fibres utilisées dans la production du papier. Par hydrolyse alcaline (NaOH 2 N, 20 °C) suivie par hydrolyse acide (Dioxane/2N HCl (9 : 1, v/v), reflux) ils ont déterminé que la paille de blé

contenait 0,42 % d'ApC/MS (>80 % liés par liaison esters) et 0,48 % d'AF/MS (56 % liés par des liaisons esters et 44 % par des liaisons éthers) (Pan, Bolton, et Leary 1998). Scalbert *et al.* (Scalbert *et al.* 1985), ont extrait de cette même paille de blé, les acides phénoliques liés à la lignine par des liaisons esters par hydrolyse alcaline (NaOH 2 M, 35 °C, 1 h) et ceux liés par des liaisons éthers par hydrolyse acide (dioxane-HCl 2 M (9/1), 1 h, reflux). Ces mêmes étapes ont été utilisées par Xu *et al.* mais sous différentes conditions expérimentales : NaOH 1 M, 20-40 °C et 18 h pour l'hydrolyse alcaline ; et dioxane-HCl 2 M (9/1), 87 °C et 2 h pour l'hydrolyse acide. Ils ont aussi présenté une suite à ce protocole et ont montré que le traitement des lignines précipitées suite aux hydrolyses acide et alcaline de la bagasse de canne à sucre permettait de libérer 48,8 % de la totalité des acides *p*-coumariques liés par des liaisons esters et, 43,8 % de la totalité des acides féruliques liés par des liaisons éthers à la structure lignocellulosique et restants attachés à la lignine solubilisée au cours de ces extractions séquencées (Xu *et al.* 2005).

Sun *et al.* ont travaillé avec une autre méthode d'extraction en partant des lignines Organosolv. Ils ont récupéré la totalité des acides phénoliques par hydrolyse alcaline (NaOH 4 M, 170 °C, 2 h). Les acides hydroxycinnamiques estérifiés ont été récupérés à partir de la lignine en milieu alcalin dilué (NaOH 1 M) et à température ambiante. Les acides étherifiés ont été quant à eux déduits par calcul. Ils ont montré qu'en plus des acides férulique et *p*-coumarique qui sont dominants, d'autres acides hydroxycinnamiques sont aussi liés par des liaisons éthers et esters à la lignine. L'acide *p*-hydroxybenzoïque a été détecté. Il est lié par des liaisons esters à la lignine dans la paille de blé et le bois du peuplier et lié par des liaisons éthers à la lignine dans la paille de riz, de seigle, d'orge et dans la tige de maïs (Sun *et al.* 2002).

Krygier *et al.* ont travaillé dans le même objectif sur les graines de colza. Ils ont extrait les acides phénoliques libres avec le mélange méthanol-acétone-eau suivi par une hydrolyse alcaline (Krygier, Sosulski, et Hogge 1982). Cronier *et al.*, ont aussi utilisé l'hydrolyse alcaline (NaOH 4 M, à 170 °C, pendant 2 h) pour déterminer les acides hydroxycinnamiques liés par des liaisons esters et éthers, et l'oxydation du nitrobenzène en milieu basique et la thioacidolyse pour déterminer la composition de la lignine dans les fibres du chanvre tout au long de la période du développement de la plante (Crônier, Monties, et Chabbert 2005). Parmi les acides phénoliques liés, ils ont pu extraire presque exclusivement l'acide férulique en de très faibles quantités (47-115 µg/g). Les autres acides phénoliques étaient présents sous forme de traces. Parmi les

produits de dégradation de la lignine, des traces d'acides phénoliques ont également été détectées.

Ces études ont mené à des conclusions sur les répartitions des différents acides phénoliques et sur le type de liaison chimique impliquée (Tableau II.29).

Tableau II.29 : Exemples de répartition des acides férulique et coumarique dans la matière végétale et types de liaisons chimiques engagées

Référence	Matière végétale	Acide férulique lié par liaisons éthers	Acide <i>p</i> -coumarique lié par liaisons esters
Sun <i>et al.</i>, 2002	Paille de riz, de seigle, d'orge et tige de maïs	52-68 %	67-84 %
Krygier <i>et al.</i>, 1982	Graines de colza	Trace	Faible teneur (trace - 2,9 mg/100g de farine)
Cronier <i>et al.</i>, 2005	Fibres de chanvre	Faible teneur (47-115 µg/g)	Trace
Scalbert <i>et al.</i>, 1985	Paille de blé	35-75 % (1,1%/MS de LA)	Presque la totalité
Pan, Bolton, et Leary 1998	Paille de blé	44 % des AF	> 80 % des ApC
Xu <i>et al.</i>, 2005	Bagasse de canne à sucre	45-56 %	70-76 %
Lozovaya <i>et al.</i>, 1999	Sarrasin, soja et lin	60-80 %	-

MS de LA : Masse sèche de la lignine extraite en milieu alcalin

Bien que nous ayons choisi d'adapter la méthode de Xu *et al.* (Xu *et al.* 2005), d'autres conclusions et méthodes ont été mentionnées dans la littérature. Par exemple pour Lozovaya *et al.* (Lozovaya *et al.* 1999), l'hydrolyse alcaline à froid permet d'extraire, dans les plantes dicotylédones, les acides phénoliques qui sont liés aux composants de la paroi cellulaire par des liaisons esters. Par contre l'extraction de la matière végétale, en milieu alcalin concentré et à chaud, permet de couper les liaisons éthers.

Il faut noter que la récupération des acides phénoliques liés est difficile et il a été rapporté que la totalité des acides phénoliques n'a jamais été libérée quelle que soit la méthode utilisée mais au contraire toujours sous-estimée (Hatfield, Ralph, et Grabber 1999). Prenons par exemple l'étude effectuée par Wang *et al.* 2013, qui a montré qu'une certaine quantité d'ApC fortement attachée à la lignine par des liaisons esters n'a pas pu être extraite par hydrolyse alcaline douce (NaOH 1 M, pendant 2 h dans l'obscurité) même à 100 °C.

II.3.1. Présentation de la technique d'extraction séquencée

Le protocole expérimental appliqué dans cette partie a donc été choisi en s'appuyant sur les travaux antérieurs et principalement sur ceux de Xu *et al.* 2005 et Scalbert *et al.* 1985. Ce protocole va permettre d'isoler les acides férulique et *p*-coumarique ainsi que d'autres composés phénoliques liés à la paroi cellulaire, et de les quantifier en solution.

Ce protocole conduit ainsi à la détermination des pourcentages d'acides férulique et *p*-coumarique libres et liés aux composants de la paroi végétale par des liaisons ester et éther. Ces derniers ont été isolés par une hydrolyse alcaline suivie d'une hydrolyse en milieu acide (Figure II.28).

A noter que dans le cas de notre étude, les quantités de lignine et d'hémicelluloses précipitées étant faibles, leur hydrolyse n'a pas été possible. Les acides phénoliques qui restaient attachés à la lignine, aux hémicelluloses ou au complexe dans les hydrolysats, n'ont pas été récupérés et leurs teneurs ont donc été négligées.

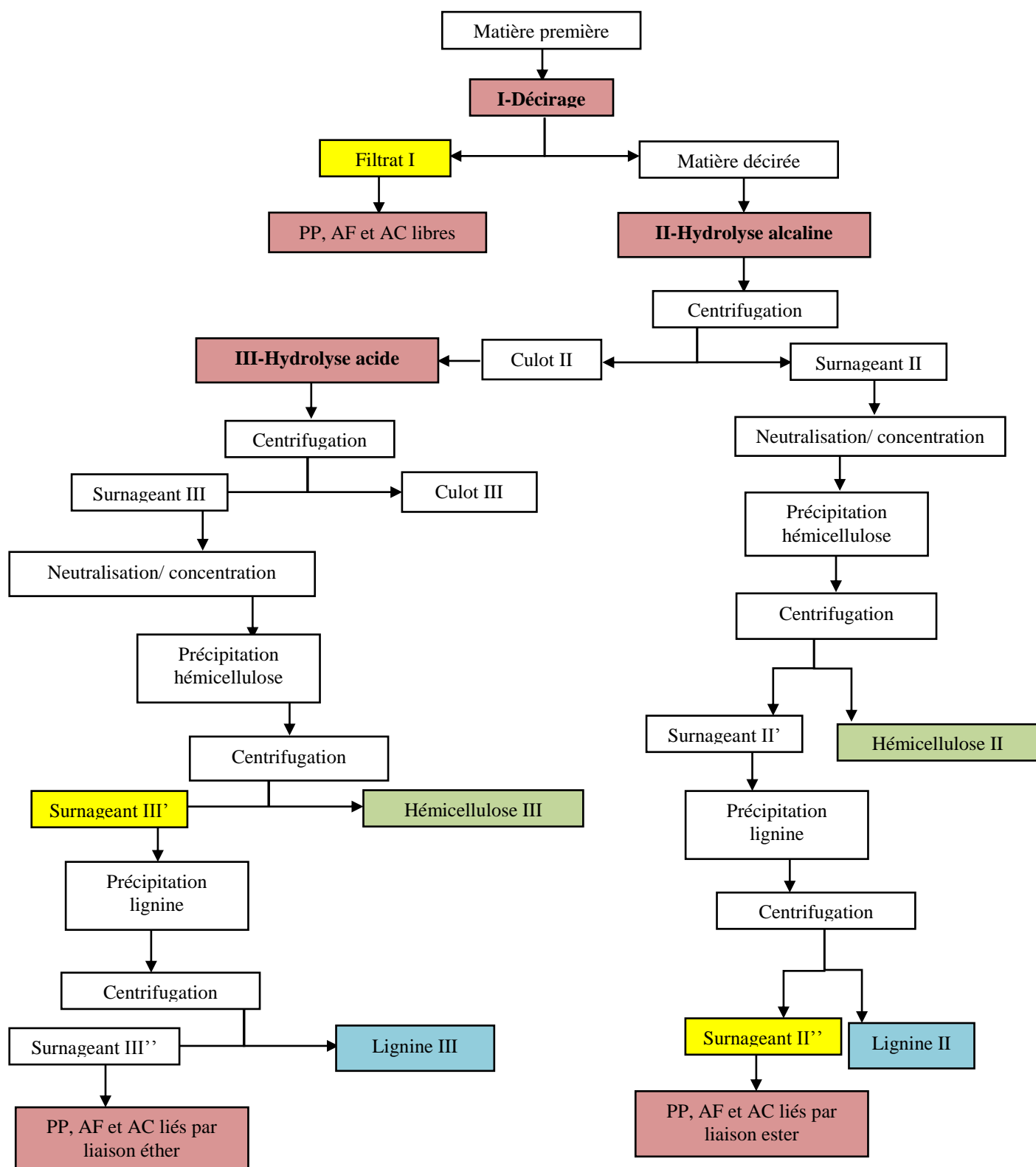


Figure II.28 : Schéma global du protocole expérimental de l'hydrolyse séquentielle (PP : Composés phénoliques totaux ; AF : Acide Férulique ; AC : Acide p-Coumarique)

Etape I : Décirage et extraction des composés phénoliques libres

Cette étape consiste à décirer la matière première c'est-à-dire à éliminer les molécules hydrophobes pouvant former une barrière pour la diffusion du solvant polaire dans la matière et rendre difficile l'attaque des liaisons dans la structure lignocellulosique et donc l'extraction des composés phénoliques. Le décirage a été effectué en utilisant le mélange toluène-éthanol 2 : 1 (v/v) dans un extracteur Soxhlet pendant 6 h. Selon la littérature, le résidu est alors exempt de cires, de matières grasses et des extractibles autres que les protéines et les pectines (Vignon, Garcia-Jaldon, et Dupeyre 1995 ; Xu *et al.* 2005). L'extrait obtenu est analysé afin de quantifier les composés phénoliques qui y sont présents et considérés comme libres c'est-à-dire non liés à la paroi cellulaire de la matière végétale.

Etape II : Acide férulique et acide coumarique liés par des liaisons esters et autres composés phénoliques (hydrolyse alcaline)

Le résidu solide issu de l'étape I est mis en œuvre pour l'extraction des composés phénoliques liés par des liaisons esters par hydrolyse alcaline (NaOH 1 M, 30 °C, 18 h sous N₂ et sous agitation). En s'appuyant sur la littérature, seuls les composés phénoliques estérifiés sont extraits dans ces conditions tandis que la mise en œuvre de NaOH 4 M libèrerait la totalité des composés phénoliques (Sun *et al.* 2002).

La réaction d'hydrolyse d'un ester en milieu basique est la suivante :



Appliquée au complexe lignine/acides phénoliques/ sucres et après neutralisation, elle conduit aux produits suivants :

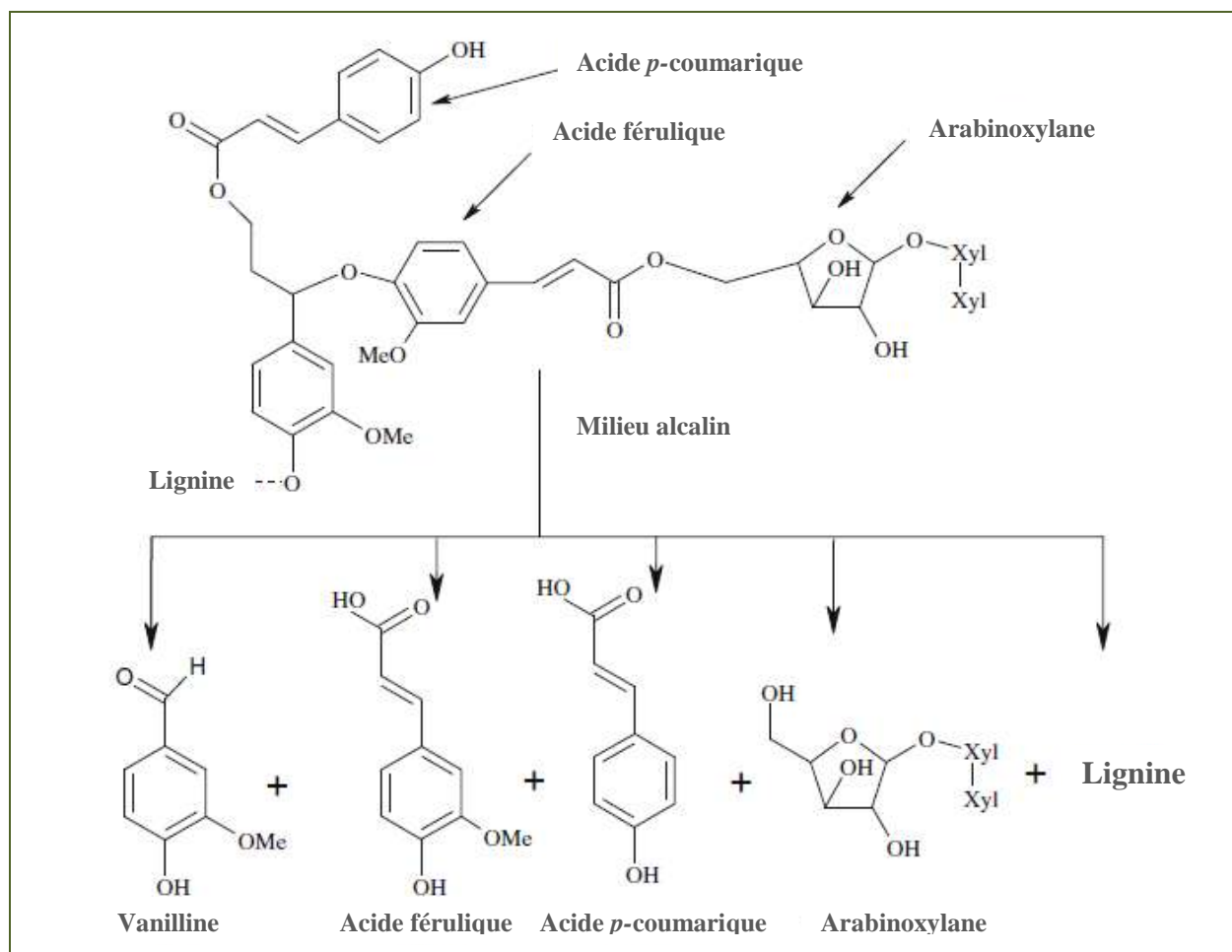


Figure II.29 : Hydrolyse, en milieu alcalin, des liaisons formant le complexe lignine/acides phénoliques/ sucres (Buranov et Mazza 2009)

L'une des principales méthodes de récupération et de purification des hémicelluloses consiste à précipiter les fractions polysaccharidiques par addition de solvants organiques miscibles à la solution aqueuse. Bien que l'éthanol soit le plus couramment utilisé, le méthanol, l'acétone ainsi que d'autres solvants organiques peuvent également être appliqués pour le fractionnement de l'hémicellulose. Dans ces conditions une fraction de la matière hémicellulosique reste en solution, et n'est généralement pas récupérée. Cette étape peut être améliorée par précipitation fractionnée de l'hémicellulose (plusieurs répétitions de l'étape de précipitation) et la précipitation progressive (répétition avec augmentation progressive de la concentration en éthanol).

La précipitation des hémicelluloses est influencée par le temps et la température. Si la solution ne donne aucun précipité visible, il suffit de la laisser au repos ou d'y ajouter des cations (Peng *et al.* 2012).

Dans notre étude, la précipitation des hémicelluloses a été réalisée par addition d'éthanol puis stockage à 4 °C pour 12 h.

Etape III : Acide férulique et acide *p*-coumarique liés par des liaisons éthers (hydrolyse acide)

Le culot solide issu de l'étape II est soumis à une hydrolyse acide (L/S = 25, dioxane-HCl 2 M (9 : 1, v/v), 87 °C, 2 h et sous agitation) pour extraire les composés phénoliques liés par des liaisons éthers à la lignine. Ce sont les acides phénoliques restants liés par des liaisons alkyl-aryl-éther.

II.3.2. Application à la chènevotte

La répartition de la matière sèche et de la matière organique pour les différentes sorties du procédé d'extraction est représentée dans le Tableau II.30.

Tableau II.30 : Répartition de la matière organique sur les étapes de l'hydrolyse séquentielle. Cas de la chènevotte

Traitement		%MO/MO_i	%MS/MO_i
Décirage	Matière première	MO = 8,92 g	MS = 9,17 g
	Filtrat I	2	2
	Matière décirée	98	101
Hydrolyse alcaline	Matière décirée	98	101
	Surnageant II	24	84
	Culot II	58	62
	Hémicelluloses II	20	21
	Lignine II	5	6
	Culot II	58	62
Hydrolyse acide	Surnageant III	24	28
	Culot III	33	33
	Hémicelluloses III	8	9
	Lignine III	4	5
	Culot III	33	33

Les rendements en composés phénoliques totaux et en acides phénoliques pour chaque étape sont exposés respectivement dans la Figure II.30 et la Figure II.31. Ils sont comparés aux résultats de l'hydrolyse alcaline en batch réalisée dans la première partie de ce chapitre.

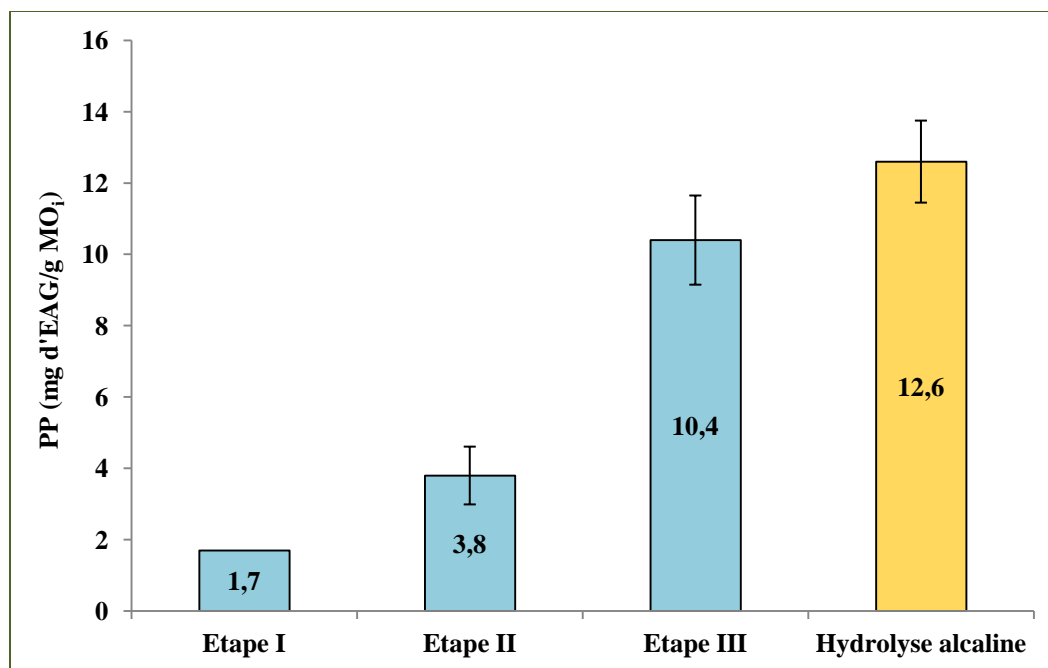


Figure II.30 : Rendements d'extraction en PP pour chaque étape de l'hydrolyse séquentielle. Comparaison avec l'hydrolyse alcaline en batch. Cas de la chènevotte

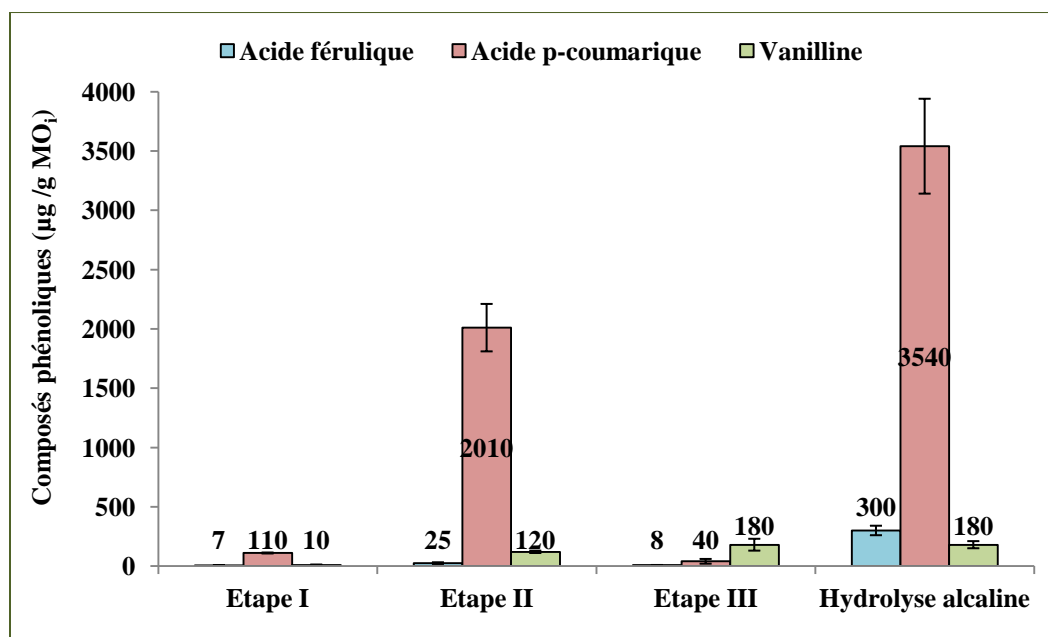


Figure II.31 : Rendements d'extraction en composés phénoliques lors de l'hydrolyse séquentielle. Comparaison avec l'hydrolyse alcaline en batch. Cas de la chènevotte

Le rendement en composés phénoliques « libres » est de 1,7 mg d'EAG/gMO_i. Cette valeur peut être discutée en fonction des résultats antérieurs acquis selon plusieurs techniques d'extraction (Partie II.2) (Tableau II.31).

Le mélange toluène/éthanol, peu polaire, conduit à une efficacité d'extraction inférieure à celle des solvants éthanoliques polaires. Plus le solvant est polaire, plus l'extractabilité des composés phénoliques augmente. Le rendement obtenu avec le mélange toluène/éthanol est par conséquent bien inférieur au potentiel de 6,9 mg d'EAG/gMO_i obtenu par extraction Fibertec à l'éthanol 60 %. L'étape I ne permet donc pas d'extraire la totalité des composés phénoliques libres. L'étape II permettra d'extraire les composés phénoliques libres résiduels en plus des composés phénoliques liés par des liaisons esters.

Les résultats montrent qu'en totalité 15,9 mg d'EAG/gMO_i sont extraits de la structure lignocellulosique lors de l'hydrolyse séquencée tandis que l'extraction du même lot de chènevotte avec NaOH 4 M à 20 °C a permis d'extraire 12,6 mg d'EAG/gMO_i. Ce rendement est surtout influencé par le résultat obtenu lors de l'étape III. En effet, en considérant les deux premières étapes, seuls 35 % de la totalité des PP présents sont extraits. Cela peut être expliqué par les conditions douces de l'hydrolyse et aussi par la proportion des composés phénoliques restant attachés à la lignine et aux hémicelluloses précipités à partir de l'hydrolysate. Le rendement élevé en étape III peut être expliqué par le fait que l'hydrolyse acide à 87 °C libère, en plus des composés phénoliques liés par des liaisons éthers aux composants de la paroi cellulaire, des dimères et oligomères à partir de la lignine (liés par des liaisons éthers ou autres types de liaisons plus résistantes).

Tableau II.31 : Rendements en polyphénols totaux libres en fonction du solvant et de la technique d'extraction. Cas de la chènevotte

Technique	Solvant	PP (µg d'EAG/g MO _i)	AF (µg/g MO _i)	ApC (µg/g MO _i)	Van (µg/g MO _i)
Soxhlet	Toluène/EtOH 2 : 1	1700	7	110	10
	EtOH 95 %	3000	7	135	22
	EtOH 60 % (v/v)	4400	26	507	21
Fibertec	EtOH 95 %	4700	8	97	<5
	EtOH 60 % (v/v)	6900	30	207	<5

Pour les acides phénoliques, 2160 µg d'ApC/gMO_i sont extraits de la structure lignocellulosique lors de l'hydrolyse séquencée en trois étapes tandis que 3540 µg d'ApC/gMO_i sont obtenus par hydrolyse alcaline (NaOH 4 M). Les rendements mesurés lors des étapes I et III sont très faibles. Ceci est aussi le cas pour l'AF pour lequel la somme des rendements des 3 étapes de l'extraction séquencée ne représente que 13 % du rendement par hydrolyse alcaline dure.

Pour l'étape I, les rendements sont inférieurs aux potentiels Fibertec. Les acides phénoliques libres résiduels sont alors extraits à l'étape II (hydrolyse alcaline dans des conditions dites « douces » : NaOH 1 M). Pour l'étape III, les rendements en ApC et AF sont très faibles. Xu (Xu *et al.* 2005) émet l'hypothèse que la moitié de ces deux acides phénoliques qui sont liés par des liaisons éthers, reste attachée aux hémicelluloses et lignines précipitées suite à l'étape II. Et dans notre cas, nous avons négligé l'extraction séquencée complémentaire de ces précipités vue les faibles quantités obtenues.

En s'appuyant sur ce qui a été présenté, il est possible de considérer que :

- Les rendements en acides phénoliques libres (AP (libres)) correspondent aux potentiels obtenus par extraction en absence de réactif. Ces valeurs sont obtenues en extracteur Soxhlet avec l'éthanol 60 %.
- Les acides phénoliques liés par des liaisons esters (AP (Ester)) seront calculés, en fonction des acides phénoliques libres déjà désignés et de ceux obtenus suite à l'étape I, comme suit :
$$AP (Ester) = AP (Etape II) + AP (Etape I) - AP (libres).$$
- Les acides phénoliques liés par des liaisons éthers seront calculés, en fonction des différentes étapes de l'hydrolyse séquencée, comme suit :
$$AP (Ether) = AP (hydrolyse alcaline) - (AP (Etape I) + AP (Etape II))$$

Les proportions des acides *p*-coumarique et férulique dans la chènevotte sont calculés par rapport à la totalité extraite pour chacun des deux acides et ils sont représentés dans le Tableau II.32.

2 % des acides féruliques et 46 % des acides coumariques sont liés à la lignine par des liaisons esters tandis que 89 % d'acides féruliques et 40 % d'acides *p*-coumariques sont liés par des liaisons éthers. Les proportions en ApC estérifiés et étherifiés sont alors comparables tandis que la majorité des AF est liée par des liaisons éthers à la structure lignocellulosique.

Pour la chènevotte, en plus de l'ApC qui est le plus abondant et de l'AF, 19 autres composés ont été détectés par HPLC. Plusieurs standards ont été injectés afin de pouvoir identifier ces composés. L'acide syringique et la vanilline ont été les seuls composés identifiés. Ces composés peuvent former des ponts entre les fragments de lignine de la paroi cellulaire. Les quantités considérables de vanilline, quantifiées sous les deux formes de liaison ; ester et éther, montrent que cette dernière est probablement liée à la lignine, mais ne participe pas à des ponts éthers

entre la lignine et les polysaccharides (Wang *et al.* 2013). Selon Morrison *et al.* (1993), ces composés résultent probablement de la dégradation de la lignine : la vanilline provient des unités gaïacyle et l'acide syringique des unités syringyle.

Tableau II.32 : Répartition des liaisons dans la structure lignocellulosique pour les acides férulique et coumarique. Cas de la chènevotte

Acides phénoliques	Total (µg/g MO _i)	Libre (%)	Ester (%)	Ether (%)
Acide férulique	300	9	2	89
Acide <i>p</i> -coumarique	3540	14	46	40
Ratio ApC/AF	12	20	269	5

Les taux de lignine et d'hémicellulose récupérés au cours des étapes II et III sont représentés dans le Tableau II.33. Les deux étapes d'hydrolyse conduisent à la dissolution de quantités équivalentes de lignine, soit 31 % de la totalité de la lignine présente.

La somme des quantités de lignine et des hémicelluloses récupérées au cours des étapes II et III de l'hydrolyse séquencée de la chènevotte est de 40,3 % par rapport à la matière sèche initiale. Cette valeur comparée à la somme des taux de lignine et des hémicelluloses obtenus selon la méthode *Van Soest and Wine* (II.1.1.3.b) et qui est de 36,2 % apparaît cohérente. L'écart entre ces deux valeurs peut être lié aux méthodes expérimentales appliquées.

Tableau II.33 : Taux de lignine et des hémicelluloses récupérés par hydrolyse séquencée de la chènevotte. Comparaison avec la méthode Van Soest and Wine

Exprimé en %MS/%MS _i	
Lignine soluble/hydrolyse alcaline	5,7
Lignine soluble/hydrolyse acide	5,6
Lignine totale solubilisée	11,3
Hémicellulose soluble/hydrolyse alcaline	20,1
Hémicellulose soluble/hydrolyse acide	8,9
Hémicellulose totale solubilisée	29,0
Total Hémicellulose + lignine	40,3
Hémicellulose + lignine/méthode <i>Van Soest and Wine</i>	36,2

II.3.3. Application à la poudre organique

Le même protocole expérimental a été appliqué au deuxième coproduit qu'est la poudre organique. La répartition de la matière organique pour les différentes sorties du procédé d'extraction est représentée dans le Tableau II.34.

Tableau II.34 : Répartition de la matière organique sur les étapes de l'hydrolyse séquentielle. Cas de la poudre organique

Traitement		%MO/MO _i	%MS/MO _i
Décirage	Matière première	MO = 8,13 g	MS = 9,20 g
	Filtrat I	2	2
	Matière décirée	98	111
Hydrolyse alcaline	Matière décirée	98	111
	Surnageant II	30	158
	Culot II	59	69
	Hémicelluloses II	19	22
	Lignine II	4	5
Hydrolyse acide	Culot II	59	69
	Surnageant III	21	24
	Culot III	40	43
	Hémicelluloses III	5	7
	Lignine III	2	2

La répartition de la matière organique dans le cas de la poudre organique est comparable à celle de la chènevotte bien que les teneurs en extractibles soient bien supérieures. Par contre, les %MS/MO_i en lignine et hémicelluloses sont aussi comparables.

Les rendements en composés phénoliques obtenus suite à chacune des trois étapes sont représentés dans les Figures II.32 et II.33. Le rendement en composés phénoliques « libres » est de 2,3 mg d'EAG/gMO_i. Comparé aux résultats antérieurs (Tableau II.35), ce rendement est inférieur à celui obtenu avec les solvants éthanoliques polaires. L'extractibilité des composés phénoliques augmente avec la polarité du solvant. Ainsi, le rendement obtenu avec le mélange toluène/éthanol est inférieur au potentiel (Fibertec) de 3,3 mg d'EAG/gMO_i extraits avec l'éthanol 95 % et bien inférieur à celui de 7,8 mg d'EAG/gMO_i extraits avec le solvant hydro-alcoolique (II.1.2.4). L'étape I ne permet donc pas d'extraire la totalité des composés phénoliques libres. La fraction résiduelle est extraite lors de l'étape II conjointement aux composés phénoliques liés par des liaisons esters.

12,5 mg d'EAG/gMO_i sont extraits de la structure lignocellulosique lors de l'hydrolyse séquencée tandis que l'extraction alcaline dure de ce même lot a permis d'extraire 16,8 mg d'EAG/gMO_i. Des quantités équivalentes sont extraites lors des étapes II et III et chacune représente 40 % de la totalité des PP présents.

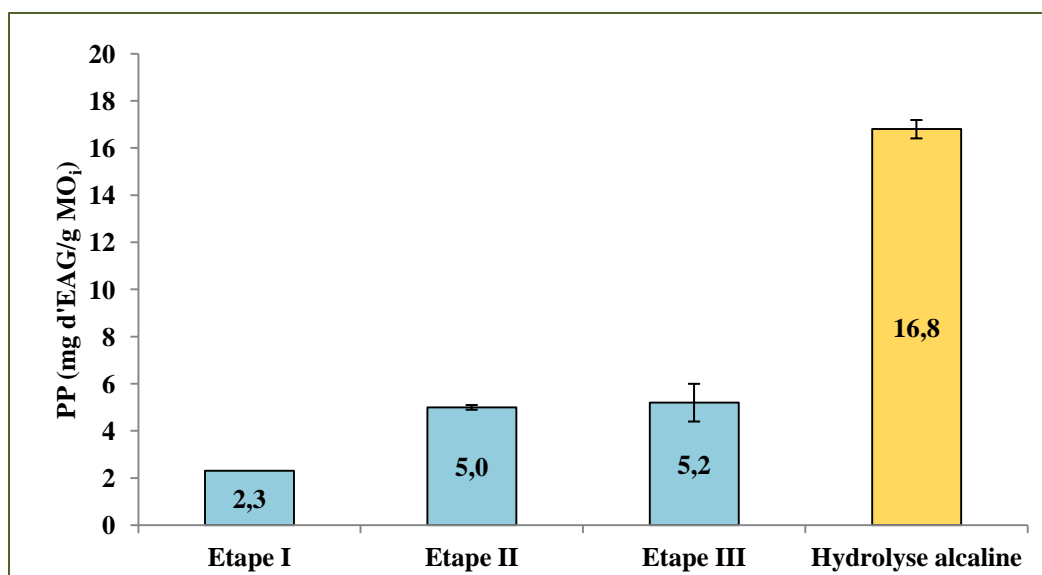


Figure II.32 : Rendements en PP obtenus par hydrolyse séquencée. Comparaison avec l'hydrolyse alcaline en batch. Cas de la poudre organique

Pour les acides phénoliques, 904 µg d'ApC/gMO_i sont extraits de la structure lignocellulosique lors de l'hydrolyse séquencée en trois étapes tandis que 1000 µg d'ApC/gMO_i sont obtenus par hydrolyse alcaline (NaOH 4 M). Les rendements en ApC évalués lors des étapes I et III sont faibles. Ce qui est aussi le cas pour l'AF. La somme des rendements en AF extraits lors des trois étapes représente 41 % de la totalité extraite par hydrolyse alcaline.

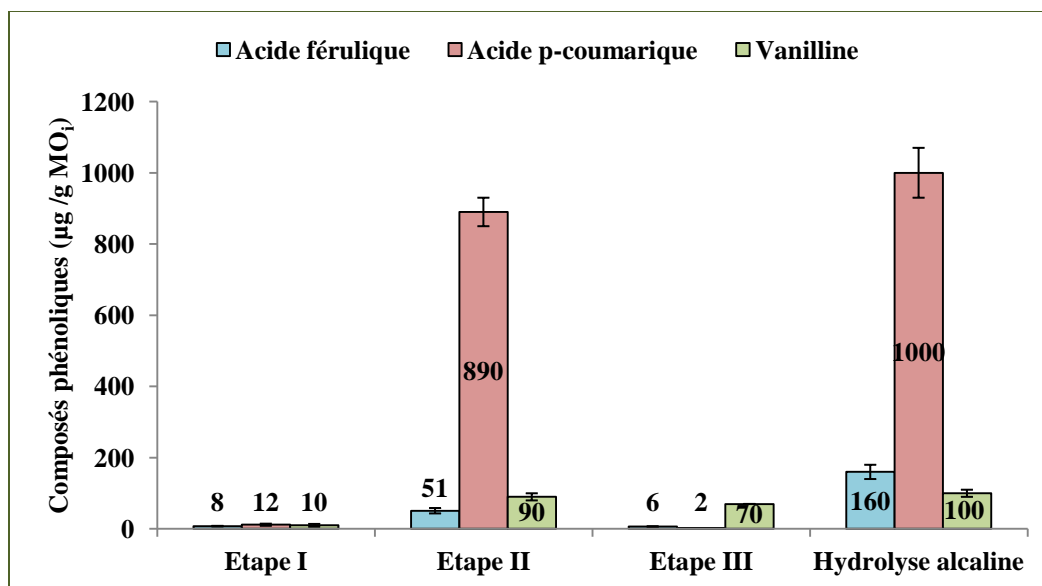


Figure II.33 : Rendements d'extraction en composés phénoliques lors de l'hydrolyse séquentielle. Comparaison avec l'hydrolyse alcaline en batch. Cas de la poudre organique

Pour l'étape I, les rendements sont inférieurs aux potentiels Fibertec. Les acides phénoliques libres résiduels sont alors extraits à l'étape II. Pour l'étape III, les rendements en ApC et AF sont très faibles donc une grande quantité doit se trouver dans les fractions précipitées des hémicelluloses et des lignines. Donc, en suivant le raisonnement présenté dans la partie chènevotte, il est possible de calculer les proportions des ApC et AF dans la poudre organique rapportées à la totalité extraite pour chacun des deux acides (Tableau II.36).

Tableau II.35 : Rendements en polyphénols totaux en fonction du solvant et de la technique d'extraction. Cas de la poudre organique

Technique	Solvant	PP (µg d'EAG/g MO _i)	AF (µg/gMO _i)	ApC (µg/gMO _i)	Van (µg/gMO _i)
Soxhlet	Toluène/EtOH 2 : 1	2300	8	12	10
	EtOH 95 %	3200	5	49	18
	EtOH 60 % (v/v)	6700	21	202	15
Fibertec	EtOH 95 %	3300	3	24	<3
	EtOH 60 % (v/v)	7800	30	61	<3

Dans la poudre organique, 24 % des acides féruliques sont liés à la structure lignocellulosique par des liaisons esters et 63 % par des liaisons éthers. Pour les acides *p*-coumariques, ce sont respectivement 70 et 10 %.

La proportion des AF libres est inférieure à celle en AF estérifiés, la majorité étant liée par des liaisons éthers à la structure lignocellulosique.

Les résultats obtenus pour la poudre organique sont comparables à ceux obtenus pour la paille de riz, de seigle, d'orge, pour la tige de maïs, du sarrasin, du soja et du lin et pour la bagasse de canne à sucre, par Sun *et al.*, Xu *et al.*, et Lozovaya *et al.* (Tableau II.29).

Les teneurs en ApC estérifiés ainsi que le ratio ApC/AF représentent, selon Wang *et al.* 2013, un indicateur de la lignification des parois cellulaires des plantes étudiées. Selon la littérature, l'ApC est principalement lié à la lignine et il se trouve le plus largement estérifié à la lignine au stade de maturité de la plante d'où son utilisation comme indicateur. La teneur en ApC estérifié dans la chènevotte (1613 µg/g MO_i) est supérieure à celle de la poudre organique (700 µg/g MO_i). Cette conclusion est cohérente avec les compositions lignocellulosiques déterminées dans le Chapitre II (partie II.1.2.3.b). En effet, les répartitions massiques des composés structuraux des parois cellulaires de la chènevotte et de la poudre organique ont été respectivement évaluées à 58/21/21 et 71/17/11 en cellulose/hémicelluloses/lignine par la méthode Van Soest and Wine. En plus d'être un indicateur de la lignification, le ratio ApC/AF est inversement associé à la digestibilité des parois cellulaires. L'AF est déposé dans les tissus végétaux lors de la formation des parois primaires et secondaires. Plus la lignification des parois cellulaires progresse, plus la libération de l'AF par saponification diminue. L'AF est un bon indicateur de la distribution de la lignine.

Tableau II.36 : Répartition des liaisons chimiques dans la structure lignocellulosique pour les acides férulique et p-coumarique. Cas de la poudre organique

Acides phénoliques	Total (µg/g MO _i)	Libre (%)	Esterifié (%)	Ethérifié (%)
Acide férulique	160	13	24	63
Acide p-coumarique	1000	20	70	10
Ratio ApC/AF	6	7	24	1

Pour la poudre organique, l'extrait final analysé comporte environ 23 composés détectés dont 5 ont été identifiés par analyse HPLC : le 4-hydroxybenzaldéhyde, le syringaldéhyde, la vanilline, l'acide p-coumarique et l'acide férulique.

En plus de l'AF et l'ApC, la vanilline, est principalement extraite en conditions acides. En se basant sur ce qui a été présenté dans la partie chènevotte, il semble qu'à l'exception des AF et

ApC qui forment des ponts entre la lignine et les polysaccharides, les 21 composés phénoliques détectés peuvent former des ponts entre les fragments de lignine de la paroi cellulaire.

Les taux de lignine et des hémicelluloses récupérés au cours des étapes II et III sont représentés dans le Tableau II.37.

Tableau II.37 : Taux de lignine et des hémicelluloses récupérés par hydrolyse séquencée de la poudre organique. Comparaison avec la méthode Van Soest and Wine

Exprimé en %MS/%MS_i	
Lignine soluble/hydrolyse alcaline	4,4
Lignine soluble/ hydrolyse acide	1,2
Lignine totale solubilisée	5,6
Hémicelluloses soluble/hydrolyse alcaline	20,1
Hémicelluloses soluble/hydrolyse acide	6,3
Hémicelluloses totale solubilisée	26,4
Total Hémicelluloses + lignine	32,0
Hémicelluloses + lignine/méthode Van Soest and Wine	17,7

Dans la poudre organique, l'hydrolyse alcaline a permis de dissoudre 63,4 % de lignine comparé à 16,4 % dans les conditions acides.

La somme des taux de lignine et des hémicelluloses récupérés au cours des étapes II et III de l'hydrolyse séquencée de la poudre organique est de 32,0 % par rapport à la MS_i. Cette valeur montre un écart important par rapport à la somme des taux de lignine et des hémicelluloses évalués selon la méthode *Van Soest and Wine* (II.1.2.2.b) et qui est de 17,7 %/MS_i. Cet écart est directement lié à la quantité des hémicelluloses récupérées au cours de l'hydrolyse séquencée, cette dernière ayant pu être surestimée à cause d'une précipitation à l'éthanol qui aurait précipité d'autres classes de molécules, en plus des hémicelluloses.

II.3.4. Conclusions sur l'extraction séquencée

L'hydrolyse séquencée réalisée afin de déterminer les proportions en ApC et AF libres et liés par des liaisons esters et éthers à la paroi cellulaire de la chènevotte et de la poudre organique, a montré que :

- L'étape I ne permet pas d'extraire la totalité des composés phénoliques libres. En effet, les résultats collectés par les différentes techniques d'extractions appliquées dans ce chapitre permettent de remettre en question la notion de « molécules libres » et de leur extraction totale par une seule méthode de référence.
- L'étape III ne permet pas de rompre toutes les liaisons éthers qui lient les ApC et AF à la lignine.
- L'hydrolyse alcaline concentrée est la méthode la plus efficace pour extraire la totalité des acides phénoliques.

A l'issue de ces travaux, nous sommes en mesure de proposer un nouvel enchaînement d'étapes d'extraction permettant d'éviter la surestimation des liaisons type ester et la sous-estimation des liaisons type éther. Notre protocole diffère ainsi des études proposées dans la littérature. Il est composé par une première étape d'extraction de composés phénoliques libres, effectuée en extracteur Soxhlet avec un solvant hydro-alcoolique. La deuxième étape concerne l'extraction des composés phénoliques liés par des liaisons esters. Elle est effectuée par hydrolyse alcaline (NaOH 1 M). Et la dernière étape est une hydrolyse alcaline (NaOH 4 M) permettant d'extraire la totalité des composés phénoliques. L'extraction des composés phénoliques liés par des liaisons éthers est estimée par soustraction des composés phénoliques extraits en étape II. « La totalité des composés phénoliques » désignée dans la dernière étape est donnée à titre indicatif puisqu'elle ne comprend pas les acides phénoliques résiduels fortement liés à la lignine ou aux hémicelluloses et qui nécessiteraient une étape supplémentaire d'extraction pour être quantifiés.

II.4. Conclusion

La chènevotte et la poudre organique sont les coproduits d'une industrie existant depuis de nombreuses décennies. Néanmoins, très peu de données sur la caractérisation physico-chimique ou l'extraction par solvant de ces deux matières premières existaient jusqu'alors. L'ensemble des essais qui ont pu être réalisés dans ce chapitre a permis d'enrichir les connaissances sur ces deux coproduits méconnus.

Les caractéristiques commerciales revendiquées pour la chènevotte et la poudre organique tiennent essentiellement sur leur faible densité et leur grande capacité d'absorption. Notre approche globale de caractérisation morphologique, physique et chimique a permis de qualifier plus précisément les fractions pariétales de la structure lignocellulosique et les constituants non fibreux. La répartition fibres/non fibres diffère pour ces 2 coproduits : 87/13 pour la chènevotte contre 62/38 pour la poudre organique. La poudre organique semble ainsi représenter un bon candidat pour une extraction par solvant des molécules non liées à la structure lignocellulosique. Les teneurs en lignine de 18 %/MS ou 7 %/MS pour la chènevotte ou la poudre organique laissent présager un potentiel intéressant en composés phénoliques liés, composés complémentaires aux molécules phénoliques libres présentes dans la fraction non pariétale. Notre intérêt s'est donc porté sur l'ensemble des composés phénoliques et plus particulièrement sur les acides phénoliques à haut potentiel économique que sont les acides *p*-coumarique et férulique. Dans une première approche analytique extractive, nous avons pu déterminer que l'extraction à reflux était la méthode la plus efficace pour l'extraction des composés phénoliques en général et des deux acides phénoliques en particulier. Les rendements en composés phénoliques totaux sont compris entre 4 et 8 mg/gMS pour les deux matières premières quel que soit le solvant d'extraction. L'extraction aqueuse permet quant à elle d'atteindre les rendements les plus élevés pour les acides *p*-coumarique et férulique : 475 µg/g MO_i et 80 µg/g MO_i pour la chènevotte, 60 µg/g MO_i et 20 µg/g MO_i la poudre organique.

Dans une deuxième partie de ce chapitre, la macération, l'extraction Soxhlet et l'extraction ASE ont été mises en œuvre afin d'extraire les composés phénoliques des deux coproduits du chanvre. Le solvant conduisant aux rendements les plus importants est un mélange hydro-alcoolique (40/60) pour toutes les techniques extractives. Des rendements maximaux de 4,3 mg d'EAG/gMO_i en composés phénoliques totaux, 500 µg/g MO_i en acide *p*-coumarique et 135 µg/g MO_i en acide férulique ont été déterminés par extraction Soxhlet. Les faibles rendements en acides férulique et *p*-coumarique et en vanilline, montrent que ces trois composés sont présents en faibles quantités à l'état libre dans la chènevotte. Il semble aussi que d'autres composés phénoliques moins polaires sont présents et détectés dans les extraits. Pour atteindre l'ensemble des composés phénoliques présents dans la matière sous formes liée et libre, une hydrolyse alcaline dure a été réalisée. 12,6 mg d'EAG/gMO_i, de composés phénoliques totaux,

3540 $\mu\text{g/gMO}_i$ d'acide *p*-coumarique et 180 $\mu\text{g/g MO}_i$ d'acide férulique sont alors extraits. Dans le cas de la poudre organique, les conclusions sur les paramètres du procédé sont identiques : l'extracteur Soxhlet et le solvant hydro-éthanolique sont les plus pertinents pour atteindre les composés phénoliques libres. Des rendements maximaux de 6,7 mg d'EAG/gMO_i en composés phénoliques totaux, 200 $\mu\text{g/gMO}_i$ en acide *p*-coumarique et 20 $\mu\text{g/g MO}_i$ en acide férulique ont été mesurés. L'hydrolyse alcaline a quant à elle, conduit aux rendements suivants : 16,8 mg d'EAG/gMO_i, en composés phénoliques totaux, 950 $\mu\text{g/gMO}_i$ en acide *p*-coumarique et 160 $\mu\text{g/gMO}_i$ en acide férulique.

Dans la dernière partie du chapitre, une hydrolyse séquencée a été appliquée afin de déterminer les types de liaisons chimiques reliant les acides hydroxycinnamiques à la structure lignocellulosique et leurs proportions. Dans le cas de la chènevotte, le ratio libre/estérifié/éthérifié est de 14/46/40 pour l'acide *p*-coumarique et de 9/2/89 pour l'acide férulique. Pour la poudre organique, ces ratios sont 20/70/10 pour l'acide *p*-coumarique et 13/24/63 pour l'acide férulique. La majorité des acides féruliques est ainsi éthérifiée pour les 2 matières premières. Les acides *p*-coumariques de la poudre organique sont majoritairement estérifiés tandis que ceux présents dans la chènevotte sont liés en proportions équivalentes par liaisons ester et éther.

Notons finalement que, pour les composés phénoliques totaux, l'hydrolyse alcaline douce est deux fois moins efficace que l'hydrolyse acide dans le cas de la chènevotte tandis qu'elles sont équivalentes pour la poudre organique. Les structures lignocellulosiques des deux matières premières n'ont donc pas un comportement équivalent vis-à-vis des réactifs acides ou alcalins.

Afin d'atteindre des rendements d'extraction maximaux en acides férulique et *p*-coumarique, des conditions d'extraction par hydrolyse chimique alcaline sembleraient les plus pertinentes. Néanmoins, dans un but d'intensification des procédés d'extraction, le fractionnement en réacteur continu thermo-mécano-chimiques puis en réacteur batch assisté par micro-ondes fait l'objet de la suite de nos travaux.

II.5. Références bibliographiques

- AOAC. 1990. "Official Methods of Analysis. 15th Edn." *Association of Official Analytical Chemist* Washington DC, Etats-Unis.
- Bag, Rahime, Johnny Beaugrand, Patrice Dole, Bernard Kurek. 2011. "Viscoelastic Properties of Woody Hemp Core." *Holzforschung* 65 (2): 239–47.
- Barta, Zsolt, Emma Kreuger, Lovisa Björnsson. 2013. "Effects of Steam Pretreatment and Co-Production with Ethanol on the Energy Efficiency and Process Economics of Combined Biogas, Heat and Electricity Production from Industrial Hemp." *Biotechnology for Biofuels* 6 (1): 1–16.
- Bauer, Jonas Lewin, Britta Harbaum-Piayda, Karin Schwarz. 2012. "Phenolic Compounds from Hydrolyzed and Extracted Fiber-Rich by-Products." *LWT-Food Science and Technology* 47 (2): 246–54.
- Blasco, Cristina, Yolanda Picó. 2009. "11 Pressurized Liquid Extraction and Liquid Chromatographic Analysis of Pesticide Residues." *Handbook of Pesticides: Methods of Pesticide Residues Analysis* 6: 275.
- Blumenkrantz, Nelly, Gustav Asboe-Hansen. 1973. "New Method for Quantitative Determination of Uronic Acids." *Analytical Biochemistry* 54 (2): 484–89.
- Boulou, Pierre. 2006. *Le Chanvre Industriel: Production et Utilisations*. France Agricole Editions, Paris.
- Buranov, Anvar U, G Mazza. 2009. "Extraction and Purification of Ferulic Acid from Flax Shives, Wheat and Corn Bran by Alkaline Hydrolysis and Pressurised Solvents." *Food Chemistry* 115 (4): 1542–48.
- Cappelletto, P., M. Brizzi, F. Mongardini, B. Barberi, M. Sannibale, G. Nenci, M. Poli, G. Corsi, G. Grassi, P. Pasini. 2001. "Italy-Grown Hemp: Yield, Composition and Cannabinoid Content." *Industrial Crops and Products* 13: 101–13.
- Correia, Fatima, DN Roy, Krishan Goel. 2001. "Chemistry and Delignification Kinetics of Canadian Industrial Hemp." *Journal of Wood Chemistry and Technology* 21 (2): 97–111.
- Crônier, David, Bernard Monties, Brigitte Chabbert. 2005. "Structure and Chemical Composition of Bast Fibers Isolated from Developing Hemp Stem." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (21): 8279–89.
- Culhaoglu, Tanya, Dan Zheng, Valérie Méchin, Stéphanie Baumberger. 2011. "Adaptation of the Carrez Procedure for the Purification of Ferulic and P-Coumaric Acids Released from Lignocellulosic Biomass prior to LC/MS Analysis." *Journal of Chromatography B* 879 (28): 3017–22.
- Galanakis, CM, V Goulas, S Tsakona, GA Manganaris, V Gekas. 2013. "A Knowledge Base for the Recovery of Natural Phenols with Different Solvents." *International Journal of Food Properties* 16 (2): 382–96.
- Gandolfi, Stefano, Gianluca Ottolina, Sergio Riva, Giuseppe Pedrocchi Fantoni, Ilabahren. Patel. 2013. "Complete Chemical Analysis of Carmagnola Hemp Hurds and Structural Features of Its Components." *BioResources* 8: 2641–56, 16 pp.
- Guo, Tao, Yi Sun, Yin Sui, Famei Li. 2003. "Determination of Ferulic Acid and Adenosine in Angelicae Radix by Micellar Electrokinetic Chromatography." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 375 (6): 840–43.

- Hao, Meili, Trust Beta. 2012. "Qualitative and Quantitative Analysis of the Major Phenolic Compounds as Antioxidants in Barley and Flaxseed Hulls Using HPLC/MS/MS." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92 (10): 2062–68.
- Hatfield, R. D., J. Ralph, J. H. Grabber. 1999. "Cell Wall Cross-Linking by Ferulates and Diferulates in Grasses." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79 (3): 403–7.
- Kim, Jin-Woo, G Mazza. 2006. "Optimization of Extraction of Phenolic Compounds from Flax Shives by Pressurized Low-Polarity Water." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (20): 7575–84.
- Krygier, Krzysztof, Frank Sosulski, Lawrence Hogge. 1982. "Free, Esterified, and Insoluble-Bound Phenolic Acids. 1. Extraction and Purification Procedure." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 30 (2): 330–34.
- Lavoie, Jean-Michel, Romain Beauchet. 2012. "Biorefinery of Cannabis Sativa Using One-and Two-Step Steam Treatments for the Production of High Quality Fibres." *Industrial Crops and Products* 37 (1): 275–83.
- Lee, Mei-Hwa, Chuan-Chuan Lin. 2007. "Comparison of Techniques for Extraction of Isoflavones from the Root of Radix Puerariae: Ultrasonic and Pressurized Solvent Extractions." *Food Chemistry* 105 (1): 223–28.
- Liu, Zhilan, Juan Wang, Pingniang Shen, Chengyun Wang, Yongjia Shen. 2006. "Microwave-Assisted Extraction and High-Speed Counter-Current Chromatography Purification of Ferulic Acid from Radix Angelicae Sinensis." *Separation and Purification Technology* 52 (1): 18–21.
- Lozovaya, Vera V., Tatyana A. Gorshkova, Elena V. Yablokova, Natalya I. Rumyantseva, Alfiya Valieva, Alexander Ulanov, Jack M. Widholm. 1999. "Cold Alkali Can Extract Phenolic Acids That Are Ether Linked to Cell Wall Components in Dicotyledonous Plants (buckwheat, Soybean and Flax)." *Phytochemistry* 50 (3): 395–400.
- Lu, Guang-Hua, Kelvin Chan, Kelvin Leung, Chi-Leung Chan, Zhong-Zhen Zhao, Zhi-Hong Jiang. 2005. "Assay of Free Ferulic Acid and Total Ferulic Acid for Quality Assessment of Angelica Sinensis." *Journal of Chromatography A* 1068 (2): 209–19.
- Magro, Christian. 1995. "Valorisation Des Pailles de Blé Par Fractionnement Thermo-Mécano-Chimique Dans Un Réacteur Bivis." Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Morrison, W Herbert, Danny E Akin, David S Himmelsbach, Gary R Gamble. 1993. "Investigation of the Ester- and Ether- linked Phenolic Constituents of Cell Wall Types of Normal and Brown Midrib Pearl Millet Using Chemical Isolation, Microspectrophotometry and ¹³C NMR Spectroscopy." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 63 (3): 329–37.
- Owen, RW, R Haubner, WE Hull, G Erben, B Spiegelhalder, H Bartsch, B Haber. 2003. "Isolation and Structure Elucidation of the Major Individual Polyphenols in Carob Fibre." *Food and Chemical Toxicology* 41 (12): 1727–38.
- Pan, George X, Jennifer L Bolton, Gordon J Leary. 1998. "Determination of Ferulic and P-Coumaric Acids in Wheat Straw and the Amounts Released by Mild Acid and Alkaline Peroxide Treatment." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (12): 5283–88.
- Peng, Feng, Pai Peng, Feng Xu, Run-Cang Sun. 2012. "Fractional Purification and Bioconversion of Hemicelluloses." *Biotechnology Advances* 30 (4): 879–903.
- Quan, Can, Yongyue Sun, Jia Qu. 2009. "Ultrasonic Extraction of Ferulic Acid from Angelica Sinensis." *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 87 (4): 562–67.

- Sarkar, Suparna, Víctor H Alvarez, Marleny DA Saldaña. 2014. "Relevance of Ions in Pressurized Fluid Extraction of Carbohydrates and Phenolics from Barley Hull." *The Journal of Supercritical Fluids* 93: 27–37.
- Scalbert, Augustin, Bernard Monties, Jean-Yves Lallemand, Eric Guittet, Christian Rolando. 1985. "Ether Linkage between Phenolic Acids and Lignin Fractions from Wheat Straw." *Phytochemistry* 24 (6): 1359–62.
- Sheu, SJ, YS Ho, YP Chen, HY Hsu. 1987. "Analysis and Processing of Chinese Herbal Drugs; VI. The Study of Angelicae Radix." *Planta Medica* 53 (04): 377–78.
- Singleton, VL, Joseph A Rossi. 1965. "Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents." *American Journal of Enology and Viticulture* 16 (3): 144–58.
- Sun, RunCang, XF Sun, SQ Wang, W Zhu, XY Wang. 2002. "Ester and Ether Linkages between Hydroxycinnamic Acids and Lignins from Wheat, Rice, Rye, and Barley Straws, Maize Stems, and Fast-Growing Poplar Wood." *Industrial Crops and Products* 15 (3): 179–88.
- Sun, Yongyue, Shufen Li, Huiting Song, Songjiang Tian. 2006. "Extraction of Ferulic Acid from Angelica Sinensis with Supercritical CO₂." *Natural Product Research* 20 (9): 835–41.
- Tapin, Sandra, Jean-Claude Sigoillot, Marcel Asther, Michel Petit-Conil. 2006. "Feruloyl Esterase Utilization for Simultaneous Processing of Nonwood Plants into Phenolic Compounds and Pulp Fibers." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (10): 3697–3703.
- Tilay, Ashwini, Mahesh Bule, Jyoti Kishenkumar, Uday Annapure. 2008. "Preparation of Ferulic Acid from Agricultural Wastes: Its Improved Extraction and Purification." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (17): 7644–48.
- Turner, Carlton E, Mahmoud A Elsohly, Edward G Boeren. 1980. "Constituents of Cannabis Sativa L. XVII. A Review of the Natural Constituents." *Journal of Natural Products* 43 (2): 169–234.
- Van Soest, PJ, RH Wine. 1967. "Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feeds. IV. Determination of Plant Cell-Wall Constituents." *J Assn Offic Anal Chem* 50: 50–55.
- Vellingiri, Vadivel, Danila Amendola, Giorgia Spigno. 2014. "Screening of Four Different Agro-Food By-Products for the Recovery of Antioxidants and Cellulose." *Chemical Engineering* 37.
- Vignon, M.R., C. Garcia-Jaldon, D. Dupeyre. 1995. "Steam Explosion of Woody Hemp Chênevotte." *International Journal of Biological Macromolecules* 17 (6): 395–404.
- Wang, Bei, Mohini Sain, Kristiina Oksman. 2007. "Study of Structural Morphology of Hemp Fiber from the Micro to the Nanoscale." *Applied Composite Materials* 14 (2): 89–103.
- Wang, Rui, Hong-Jian Yang, Xin Yang, Bing-Hai Cao. 2013. "Four Phenolic Acids Determined by an Improved HPLC Method with a Programmed Ultraviolet Wavelength Detection and Their Relationships with Lignin Content in 13 Agricultural Residue Feeds." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93 (1): 53–60.
- Xie, Jing-Jing, Jia Lu, Zheng-Ming Qian, Yue Yu, Jin-Ao Duan, Shao-Ping Li. 2009. "Optimization and Comparison of Five Methods for Extraction of Coniferyl Ferulate from Angelica Sinensis." *Molecules* 14 (1): 555–65.
- Xu, Feng, Run-Cang Sun, Jin-Xia Sun, Chuan-Fu Liu, Bei-Hai He, Jin-Shan Fan. 2005. "Determination of Cell Wall Ferulic and P-Coumaric Acids in Sugarcane Bagasse." *Analytica Chimica Acta* 552 (1–2): 207–17.

Yokoyama, Tomoya, JF Kadla, HM Chang. 2002. “Microanalytical Method for the Characterization of Fiber Components and Morphology of Woody Plants.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (5): 1040–44.

Chapitre III:

Fractionnement de deux coproduits du chanvre pour l'obtention d'acides hydroxycinnamiques

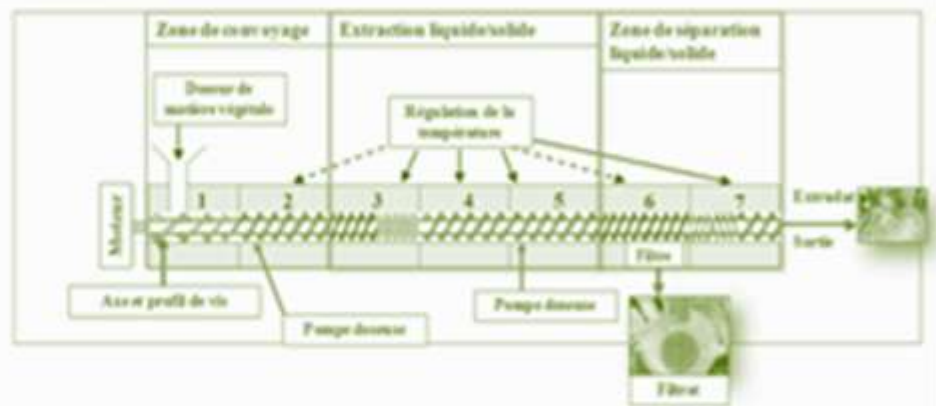


Table des matières

III. 1. Etude de l'extraction des acides phénoliques des coproduits du chanvre en extrudeur bi-vis type BC21	179
III.1.1. La chènevotte.....	185
III.1.1.1. Faisabilité de l'extraction liquide/solide en extraction par extrusion bi-vis.....	185
III.1.1.2. Influence du solvant et de la température sur l'extraction des composés phénoliques	192
III.1.1.3. Caractérisation physico-chimique des extrudats	200
III.1.2. La poudre organique.....	206
III.1.2.1. Faisabilité de l'extraction liquide/solide en extraction par extrusion bi-vis.....	206
III.1.2.2. Influence du solvant et de la température sur l'extraction des composés phénoliques	212
III.1.2.3. Caractérisation physico-chimique des extrudats	217
III. 2. Fractionnement par extraction assistée par micro-ondes	222
III.2.1. Influence du solvant et de la température sur l'extraction des composés phénoliques : cas de la chènevotte	222
III.2.2. Influence du solvant et de la température sur l'extraction des composés phénoliques : cas de la poudre organique	228
III. 3. Comparaison des technologies d'extraction des composés phénoliques.....	232
III.3.1. La chènevotte	232
III.3.2. La poudre organique.....	234
III.3.3. Vers un procédé industriel pour l'extraction des acides phénoliques	236
III. 4. Conclusion	239
III. 5. Références.....	242

Dans le chapitre précédent, la caractérisation physico-chimique des coproduits du chanvre ainsi que l'application de plusieurs méthodes d'extraction traditionnelles en absence et en présence de réactifs chimiques (macération, soxhlet, ASE, hydrolyse alcaline ou séquencée) a permis de quantifier les acides phénoliques ciblés présents dans ces matières lignocellulosiques. Outre le choix du solvant, différentes conditions opératoires (température, pression, ratio L/S, durée d'extraction, etc.) sont susceptibles d'agir sur l'efficacité de l'extraction liquide/solide de ces composés en ayant un impact sur les limitations cinétiques mais surtout diffusionnelles. En plus de ces techniques et d'autres plus classiques qui améliorent la mise en contact du solide et du liquide (actions mécaniques de broyage et d'agitation, percolation sous contrainte de pression, lixiviation sous cisaillement, extraction à contre-courant, etc), il existe des techniques innovantes combinant une déstructuration du solide à une activation des échanges : détente instantanée contrôlée (Besombes, Berka-Zougali, et Allaf 2010), explosion à la vapeur ou flash détente (Jacquet *et al.* 2010), extraction assistée par ultrasons (Hossain *et al.* 2012), par micro-ondes (Chiremba, Rooney, et Beta 2012), par champs électriques pulsés (Puértolas *et al.* 2010), par induction thermomagnétique directe (Lagunez Rivera 2006), par extraction en réacteur bi-vis (Celhay 2013), etc.

Dans l'objectif de la mise au point d'un procédé vert optimal pour l'extraction liquide/solide des acides phénoliques des coproduits du chanvre, deux technologies ont été étudiées :

- La technologie bi-vis ou extraction thermo-mécano-chimique qui est appliquée ici pour le fractionnement de la matière végétale. « Elle permet de combiner dans un seul appareillage fonctionnant en continu, défini comme un extracteur bi-vis, les opérations élémentaires de déstructuration du solide (broyage et défibrage thermomécanique du solide lignocellulosique), de mise en contact intime du liquide et du solide (mélange sous contrainte mécanique) conduisant à la solubilisation des composés extractibles, et de séparation liquide/solide (pressage et filtration) conduisant à l'extract et au raffinat » (Celhay 2013). L'extraction en bi-vis a été utilisée, par exemple, pour l'extraction des hémicelluloses de peuplier (Prat 1998; N'Diaye et Rigal 2000), pour l'extraction de l'huile des graines oléagineuses (Savoire, Lanoisellé, et Vorobiev 2013), pour l'extraction de polyphénols de bois (Celhay 2013), pour la production de pâte thermomécanique dans l'industrie papetière (Lachenal 2006) et par traitement thermo-mécano-chimique pour le prétraitement de la paille de blé dans le but de produire de l'éthanol à partir de matière lignocellulosique (Vandenbossche, Doumeng, et Rigal 2014).

- La technologie micro-ondes : l'extraction assistée par micro-ondes (MAE) a été appliquée avec succès pour l'extraction de composés bioactifs à partir des matrices végétales afin de limiter les durées d'extraction souvent longues observées par des méthodes conventionnelles. L'extraction MAE est un processus qui utilise l'énergie des micro-ondes, en présence d'un solvant, pour extraire des composés cibles de différentes matrices (Routray et Orsat 2012). Grâce à l'énergie micro-ondes, l'eau présente à l'intérieur des cellules est chauffée jusqu'à l'état vapeur et produit une pression sur la paroi cellulaire, ce qui provoque la rupture de cette dernière et la dissolution des constituants dans le solvant environnant (Wang et Weller 2006v; Mandal, Mohan, et Hemalatha 2007). Il y a plusieurs avantages à la MAE tels que la réduction du temps d'extraction et de la quantité de solvant ainsi que l'amélioration des rendements d'extraction (Wang et Weller 2006 ; Routray et Orsat 2012 ; Chemat *et al.* 2015). La MAE a été utilisée pour l'extraction de plusieurs classes de composés phénoliques provenant de divers matrices végétales, y compris les feuilles du thé vert, les pépins de raisin, les feuilles de myrte, de romarin et les racines d'angélique (Pan, Niu, et Liu 2003 ; Liu *et al.* 2006 ; Li *et al.* 2011 ; Dahmoune *et al.* 2015 ; Jacotet-Navarro *et al.* 2015).

Dans ce chapitre, nous allons étudier la faisabilité technique de la mise en œuvre d'un extracteur bi-vis de type BC21 (Clextral), et de la technologie micro-ondes pour l'extraction des polyphénols et plus particulièrement des acides phénoliques des coproduits du chanvre. Puis nous étudierons respectivement, l'efficacité de chacune des deux techniques à diffuser le solvant dans la matière végétale et à améliorer la solubilisation des composés phénoliques présents dans cette dernière. Enfin, nous comparerons les résultats à ceux obtenus par des techniques d'extraction conventionnelles (Chapitre II).

III. 1. Etude de l'extraction des acides phénoliques des coproduits du chanvre en extrudeur bi-vis type BC21

L'extracteur bi-vis mis en œuvre pour cette étude (Figure III.1) est du type BC21 (Clextral) dont les caractéristiques sont rapportées dans la partie expérimentale. Il est ici mis en œuvre comme réacteur d'extraction Thermo-Mécano-Chimique (TMC) et configuré comme un extracteur liquide/solide.

Les étapes qui se succèdent le long du profil de vis sont les suivantes :

- la matière première végétale est introduite par l'intermédiaire d'une trémie doseuse à vis dans le module 1 du fourreau de l'extracteur, et convoyée par les vis à double-filet trapézoïdal à pas direct T2F vers le module 2 où une première injection de solvant, au niveau de vis de convoyage à pas direct C2F, est effectuée par l'intermédiaire d'une pompe doseuse délivrant un débit L1, choisi en fonction du débit en solide sec introduit.
- dans le module 3, un jeu de malaxeurs bilobes Mal2 disposés à 90° assure un premier mélange sous cisaillement du liquide et du solide.
- le mélange est convoyé dans le module 4 par des vis de convoyage C2F puis soumis à une nouvelle étape de cisaillement par l'intermédiaire de malaxeurs bilobes Mal2.
- au niveau du module 5, une seconde injection de solvant est réalisée par l'intermédiaire d'une seconde pompe doseuse délivrant un débit L2.
- le module 6 est un module de filtration constitué de 4 demi-coquilles percées de trous coniques de 1 mm de diamètre à l'intérieur et de 2 mm à l'extérieur par lesquels s'écoule le filtrat.
- dans le module 7, le mélange est pressé par l'intermédiaire du contre-filet conjugué double-filet CF2C et la matière ainsi comprimée est reprise par des vis de convoyage C2F vers l'extérieur du fourreau.



Figure III.1 : Extracteur thermo-mécano-chimique BC21(Clextral)

La température du fourreau est fixée par l'intermédiaire d'indithermes régulés à la température de consigne. Les modules d'introduction du solide (module 1) et de filtration (module 6) ne sont pas chauffés. Les modules 2, 3, 4, 5 et 7 sont chauffés à la température de consigne de l'extraction. Le filtrat brut obtenu est centrifugé à l'aide d'une centrifugeuse Sigma 16K pour séparer les fines particules solides fibreuses entraînées désignées sous l'appellation « pied » du liquide clair dénommé filtrat. La matière sèche, la matière organique ainsi que la teneur en polyphénols et en acides phénoliques ont été évaluées dans les filtrats.

La Figure III.2 illustre le schéma d'extraction des co-produits du chanvre en extrudeur bi-vis et expose les différentes fractions produites par ce procédé.

L'extracteur bi-vis peut ainsi être considéré comme étant constitué de 3 zones (Figure III.3) :

- la première zone (modules 1 et 2), dans laquelle sont introduits et convoyés les coproduits solides et un premier apport de solvant, éventuellement additivé d'un réactif.
- les modules 3, 4 et 5 qui correspondent à l'étape d'extraction liquide/solide sous contrainte de cisaillement grâce à l'effet des malaxeurs bilobes puis par lavage du solide par un apport de solvant supplémentaire (injection dans le module 5).
- la troisième zone (modules 6 et 7) est celle de la séparation liquide/solide par pressage dans le contre-filet (CF2C dans le module 7) et filtration de l'extrait (module 6), le solide ainsi pressé étant convoyé vers la sortie du fourreau.

L'efficacité de l'extraction liquide/solide résultera donc de celle des trois étapes de défibrage qui augmentent les surfaces d'échange liquide/solide, de l'extraction des molécules d'intérêt lors de la mise en contact avec le solvant injecté, et de la séparation liquide/solide lors du pressage et de la filtration.

Notre objectif a été d'étudier l'extractabilité des acides phénoliques de la chènevotte et de la poudre organique. Pour cela, la faisabilité de l'extraction de chaque matière première a été évaluée. Cette étude consiste à déterminer les paramètres de fonctionnement pour lesquels la mise en œuvre de l'extrudeur comme outil de séparation liquide/solide s'est avérée possible. Les effets de la température et du solvant d'extraction sur les rendements en molécules d'intérêt ont ensuite été évalués.

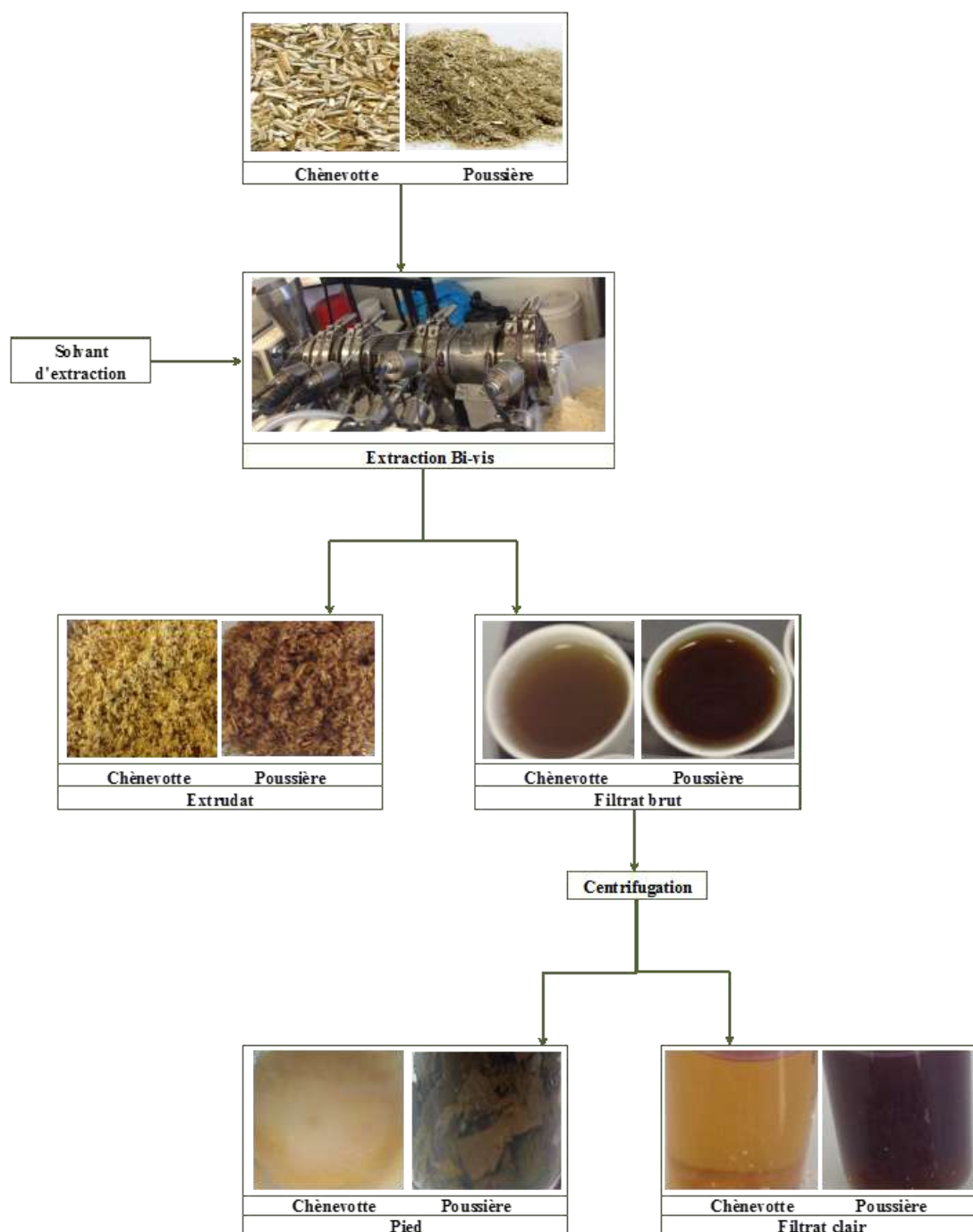


Figure III.2 : Schéma de l'extraction en extracteur bi-vis et post-traitement du filtrat brut

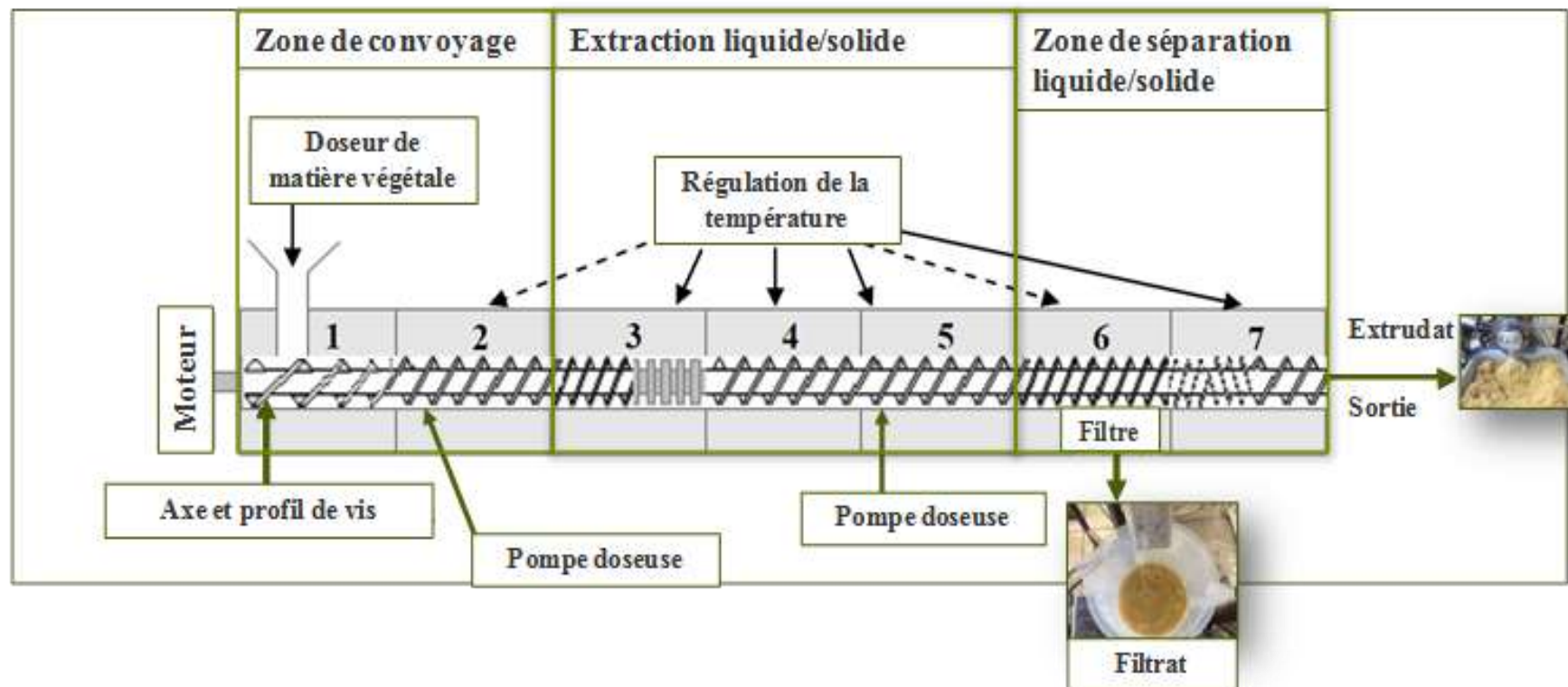


Figure III.3 : Schéma général de fonctionnement de l'extrudeur comme extracteur liquide/solide

III.1.1. La chènevotte

III.1.1.1. Faisabilité de l'extraction liquide/solide en extraction par extrusion bi-vis

Les conditions opératoires des essais préliminaires de mise en œuvre de l'extrudeur BC21 pour l'extraction des composés phénoliques de la chènevotte ont été adaptées à partir de travaux antérieurs réalisés au Laboratoire de Chimie Agro-industrielle.

Les essais préliminaires ont été effectués avec l'eau comme solvant d'extraction.

La chènevotte étant hautement fibreuse, son passage au niveau d'éléments restrictifs tels que les malaxeurs ou les contrefilets a dû être optimisée. Un premier profil de vis a été testé (Figure III.4). L'ensemble des ratios L/S testés sur la zone de filtration ne conduisait à aucune séparation liquide/solide. De plus, au niveau du contrefilet, la contrainte était très importante ce qui conduisait au blocage de la matière et donc de la bi-vis. Ce dernier a donc été changé au profit d'un contrefilet de longueur inférieure (Profil N°2). Le profil N°2 a été retenu pour l'ensemble des essais d'extraction ultérieurs. Avec ce nouveau profil, une séparation liquide/solide efficace a été atteinte pour un ratio L/S total de 6. Les conditions opératoires appliquées pour chacun des essais préliminaires sont représentées dans le Tableau III.1.

Tableau III.1 : Conditions opératoires des essais préliminaires pour l'extraction aqueuse en extrudeur bi-vis des composés phénoliques de la chènevotte

Essai	Profil 1	T (°C)	S (kg/h)	(L/S) ₁	(L/S) ₂	(L/S) total	Essai concluant
CH1	1	50	4	1	3	4	Blocage machine
CH2	1	50	4	2	2	4	Blocage machine
CH3	1	50	2.5	1,5	4,5	6	Blocage machine
CH4	2	50	2.5	1,5	4,5	6	Séparation L/S et déstructuration correctes

Les essais préliminaires nous ont aussi permis de fixer les paramètres de fonctionnement suivants :

- La vitesse de vis : 200 tpm.
- Le débit solide en chènevotte de 2,5 kg/h.
- Le ratio L/S total de 6 avec une répartition $(L/S)_1 = 1,5$ et $(L/S)_2 = 4,5$.

Profil N°1 :

	Chènevotte		Indutherme		Indutherme			Plaque/indutherme			Indutherme		Filtre			Indutherme		
Module	1		2		3			4			5		6			7		
Type de vis	T2F	T2F	C2F	C2F	Mal 2	C2F	C2F	C2F	C2F	Mal 2	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	CFC2	C2F
Pas de vis (mm) ou ou angle entre éléments restrictifs	50	50	33	25	90°	33	33	25	25	90°	33	33	25	25	16	16	-33	33
	Pompe												Filtration					

Profil N°2 :

	Chènevotte		Indutherme		Indutherme			Plaque/indutherme			Indutherme		Filtre			Indutherme					
Module	1		2		3			4			5		6			7					
Type de vis	T2F	T2F	C2F	C2F	Mal 2	C2F	C2F	C2F	C2F	Mal 2	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	CFC2	C2F	C2F	C2F
Pas de vis (mm) ou ou angle entre éléments restrictifs	50	50	33	25	90°	33	33	25	25	90°	33	33	25	25	16	16	-25	25	25	25	33
	Pompe												Filtration								

Figure III.4 : Profils de vis pour l'extraction des composés phénoliques de la chènevotte en extrudeur bi-vis BC21. Types de vis : T2F : double-filet trapézoïdal, C2F : double-filet conjugué ; Mal2 : disques malaxeurs bilobes ; CFC2 : contre-filets en double-filet conjugué

Le Chapitre II nous a appris que les rendements d'extraction étaient fortement corrélés au solvant choisi et largement améliorés par des extractions en solvant polaire sous assistance chimique. En prenant en compte les paramètres techniques inhérents à l'utilisation de l'extrudeur bi-vis comme extracteur, nous avons choisi d'étudier deux paramètres :

- La température : 50 ou 100 °C pour une extraction aqueuse
- Le solvant d'extraction pour une température fixée à 50 °C :
 - Eau
 - Ethanol 60 %
 - Extraction aqueuse alcaline : 12,7 ou 31,8 % NaOH/MO_i
 - Extraction hydro-alcoolique alcaline : 12,7 % NaOH/MO_i dans éthanol 60 %.

Ainsi, nous conservons des conditions d'extraction douces, par des solvants répondant au cahier des charges technologique mais aussi environnemental. De plus, les résultats antérieurs acquis au Laboratoire de Chimie Agro-industrielle sur la paille de blé (Magro 1995 ; Vandenbossche, Doumeng, et Rigal 2014) ont permis de conclure que :

- Les traitements alcalins dissolvent, avec une efficacité variable, les lignines, les protéines et les hémicelluloses. Ils affaiblissent et cassent les liaisons hydrogène inter-moléculaires, entraînant la solubilisation des hémicelluloses et le gonflement de la structure cristalline de la cellulose.
- En extraction TMC, seuls les traitements alcalins (20-35 % NaOH/MS) permettent d'extraire, de manière conjointe, les hémicelluloses et la lignine.

D'un point de vue structural, la libération de l'acide *p*-coumarique concerne essentiellement la rupture de liaisons esters avec la lignine tandis que la libération de l'acide férulique aura lieu par la rupture de ce même type de liaison avec les hémicelluloses mais aussi des liaisons éthers avec la lignine. Ainsi, la technique d'extraction TMC visée doit permettre l'extraction conjointe des hémicelluloses et de la lignine. De ce fait, les extractions alcalines (NaOH) ont été préférées.

Les paramètres directement acquis lors des essais sont :

- Les débits en filtrat brut en sortie de module de filtration et en extrudat en sortie du fourreau.
- Le couple moteur.

Pour chacun des essais, avant tout échantillonnage, l'extrudeur est laissé en fonctionnement pendant 15 minutes de manière à atteindre des conditions stables. Une fois le système stabilisé, le filtrat brut et l'extrudat sont collectés pendant une durée de 15 minutes.

Le Tableau III.2 rassemble les conditions opératoires et les débits entrants des solvants et de la matière végétale ainsi que les débits sortants des extrudats et des filtrats.

Lors des campagnes d'extraction nous avons constaté une faible variation du débit d'entrée de la matière solide à cause d'un phénomène de voûtage de la matière dans le doseur à vis. Les bilans matières, représentés dans le Tableau III.2, ont donc été corrigés afin de palier la dérive du doseur. Ainsi, le débit en matière organique entrante a été recalculé comme étant égal à la somme des débits en matière organique sortante. Pour chaque essai, la répartition en matière organique entre les 3 sorties du procédé a été étudiée. Le filtrat a été plus particulièrement analysé pour une détermination des composés phénoliques totaux et des acides férulique et *p*-coumarique. Ces résultats sont exposés dans le Tableau III.3 et complétés par les données acquises dans le Chapitre II et jugées pertinentes pour la discussion.

Les photographies des différents produits issus de l'extraction par extrusion bi-vis de la chènevotte, sont exposées dans la Figure III.5. Cette dernière illustre les différences d'aspect morphologique observées en fonction des conditions d'extraction.

Tableau III.2 : Conditions opératoires et débits massiques entrants et sortants pour les essais d'extraction de la chènevotte en extrudeur bi-vis BC21

Essai	L/S	T (°C)	Couple moteur	Solvant		Débit solide introduit (kg/h)			Débit liquide introduit (kg/h)	
				eau/ Ethanol	%NaOH /MO _i	Brut	Sec	Organique	L1	L2
CH4	5,9	50	24-30	100/0	0	2,53	2,32	2,26	3,75	11,25
CH5	6,2	100	19-24	100/0	0	2,41	2,21	2,15	3,75	11,25
CH6	6,5	50	24-30	40/60	0	2,37	2,17	2,11	3,82	11,61
CH7	6,7	50	0	100/0	31,8	2,24	2,05	1,99	3,8	11,25
CH8	6,9	50	0	100/0	12,7	2,17	1,99	1,93	3,69	11,25
CH9	6,8	50	0-9/11	40/60	12,7	2,20	2,02	1,96	3,75	11,25

Essai	Débit extrudat (kg/h)			Débit filtrat (kg/h)						
	Brut	Sec	Organique	Total brut	Clair brut	Clair- Sec	Clair- Organique	Pied brut	Pied -Sec	Pied - Organique
CH4	7,56	2,12	2,09	10,10	9,20	0,066	0,053	0,85	0,121	0,118
CH5	7,42	2,02	2,00	9,80	8,94	0,064	0,049	0,78	0,105	0,100
CH6	5,80	1,93	1,90	11,59	10,31	0,060	0,048	1,20	0,167	0,160
CH7	7,52	2,24	1,77	9,66	9,16	0,528	0,164	0,44	0,088	0,059
CH8	6,31	1,89	1,73	10,96	10,34	0,333	0,136	0,57	0,088	0,071
CH9	4,65	1,88	1,69	12,93	12,04	0,287	0,127	0,82	0,181	0,146

Conditions opératoires : $N = 200$ tpm, profil N°2, durée de l'extraction = 15 min, répétition extraction $n = 1$

Tableau III.3 : Rendements d'extraction en molécules d'intérêt par extraction en extrudeur bi-vis. Cas de la chènevotte

					Extrudat	Pied	Filtrat								
T (°C)	Couple moteur	% eau/ Ethanol	%NaOH/ MO _i	Rendement (mg MO/ gMO _i)	Rendement (mg MO/ gMO _i)	Matière organique (mg MO/g MO _i)	PP (mg/g MO _i)	PP/MO _E (%)	AF (µg/ gMO _i)	AF/PP (%)	Ap C (µg/ gMO _i)	Ap C/PP (%)	Van (µg/ gMO _i)	Van/PP (%)	
CH4	50	24-30	100/0	0	925,4	51,1	23,5	0,6	2,5	8,1	1,3	45	7,5	10,0	0,7
CH5	100	19-24	100/0	0	930,8	46,3	22,9	0,7	3,2	6,5	0,9	62	8,3	7,3	1,0
CH6	50	24-30	40/60	0	901,3	75,8	22,9	2,3	10,2	7,4	0,3	59	2,6	11,0	0,5
CH7	50	0	100/0	31,8	888,2	29,5	82,3	2,2	2,7	34,9	1,6	440	19,9	16,5	0,7
CH8	50	0	100/0	12,7	893,0	36,7	70,4	4,0	5,6	66,6	1,7	1127	28,5	25,0	0,7
CH9	50	0-9/11	40/60	12,7	860,7	74,4	64,9	5,8	9,0	99,0	1,7	1814	31,2	53,0	0,9
Hydrolyse alcaline	20	-	100/0	480	-	-	836	12,6	-	300	-	3540	-	180	-
AP libres	Reflux	-	-	-	-	-	-	1,7	-	26	-	507	-	-	-
AP/liaison ester	30	-	100/0	100	-	-	-	3,8	-	6	-	1613	-	-	-
AP/liaison éther	87	-	100/0	-	-	-	-	10,4	-	268	-	1420	-	-	-

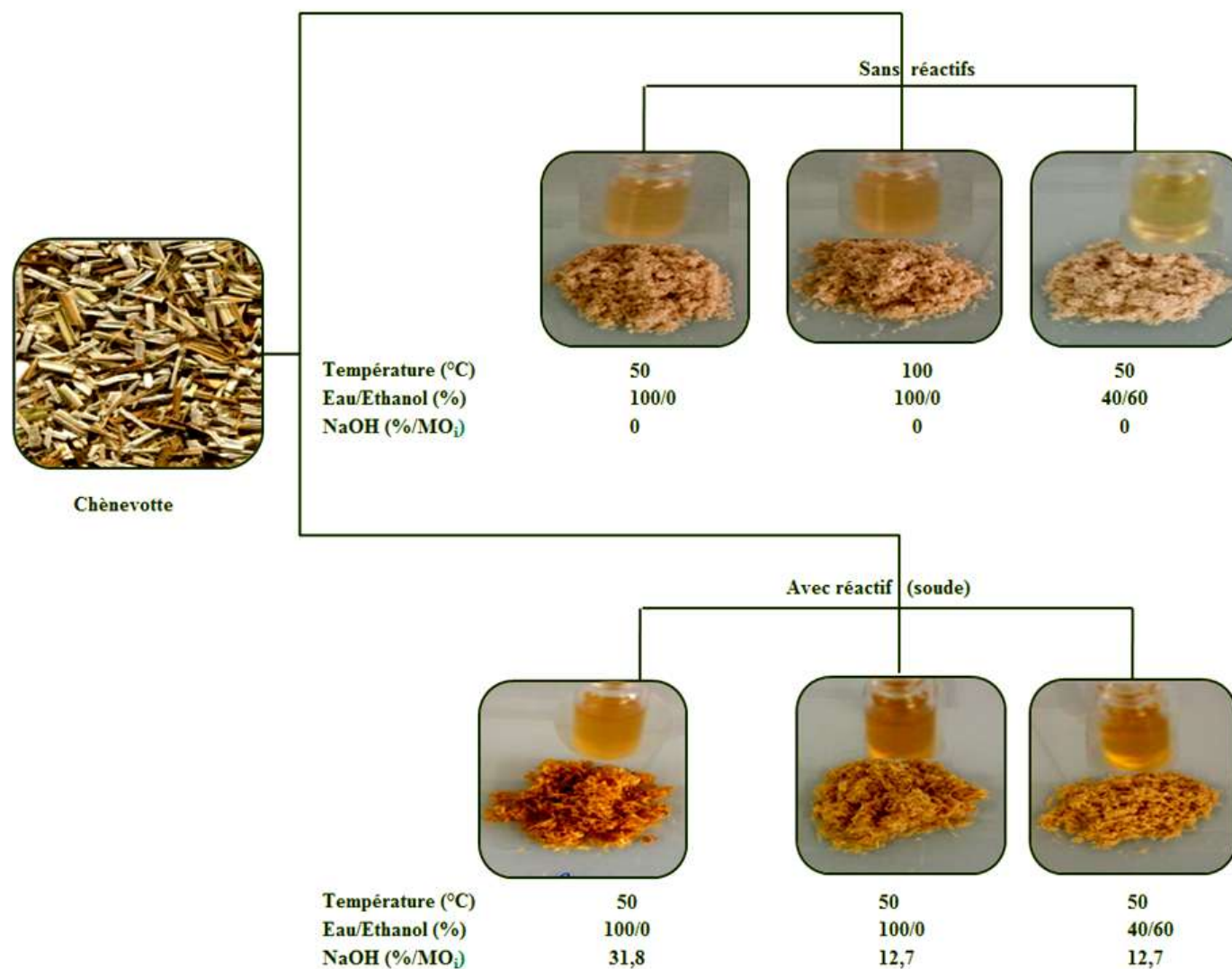


Figure III.5 : Aspect morphologique des extrudats et filtrats clairs issus de l'extraction de la chènevotte en extrudeur bi-vis

III.1.1.2. Influence du solvant et de la température sur l'extraction des composés phénoliques

L'eau agit comme un lubrifiant naturel lors de l'extraction TMC. Cet effet lubrifiant permet le passage de la matière végétale à travers les différentes zones de contrainte du profil de vis. La principale zone de contrainte est représentée par le bouchon dynamique créé au niveau du contrefilet. Une addition d'éthanol à la phase aqueuse extractante diminue le caractère lubrifiant du solvant. De ce fait, plus le taux d'éthanol augmente, plus l'avancement de la matière, dans la zone de contrainte formée par le contrefilet, peut s'avérer difficile pour un même profil. Par contre, l'addition d'un réactif alcalin tel que la soude abaisse la viscosité du mélange à l'intérieur du réacteur bi-vis et améliore la fluidification. D'un point de vue pratique, ce sont les valeurs du couple moteur qui retranscrivent ces effets (Tableau III.3).

Dans des conditions extrêmes, l'absence de lubrification dans le contrefilet peut même conduire à un autoéchauffement important et au blocage de la machine. Dans notre cas, le choix d'un profil avec un contrefilet court nous a permis de minimiser les risques d'autoéchauffement lors de nos essais hydro-alcooliques.

Les teneurs en matière sèche et matière organique des extrudats reflètent l'efficacité de la séparation liquide/solide (Figure III.6). Exprimées en g/100g d'extrudat brut et comprises entre 28 et 40 g/100 g, elles traduisent un pressage efficace et un rendement de récupération en filtrat clair appréciable pour chaque essai. Les teneurs en MS supérieures dans le cas de l'éthanol 60 % reflètent bien la diminution de la lubrification dans le contrefilet. Pour juger de l'abaissement de la tenue mécanique du solide lors de l'addition de NaOH, il est préférable de se ramener aux teneurs en MO. Cet effet n'est clairement visible que pour l'essai à 32 % NaOH/MO_i pour lequel la teneur en MO de l'extrudat est inférieure à celle mesurée sans addition alcaline.

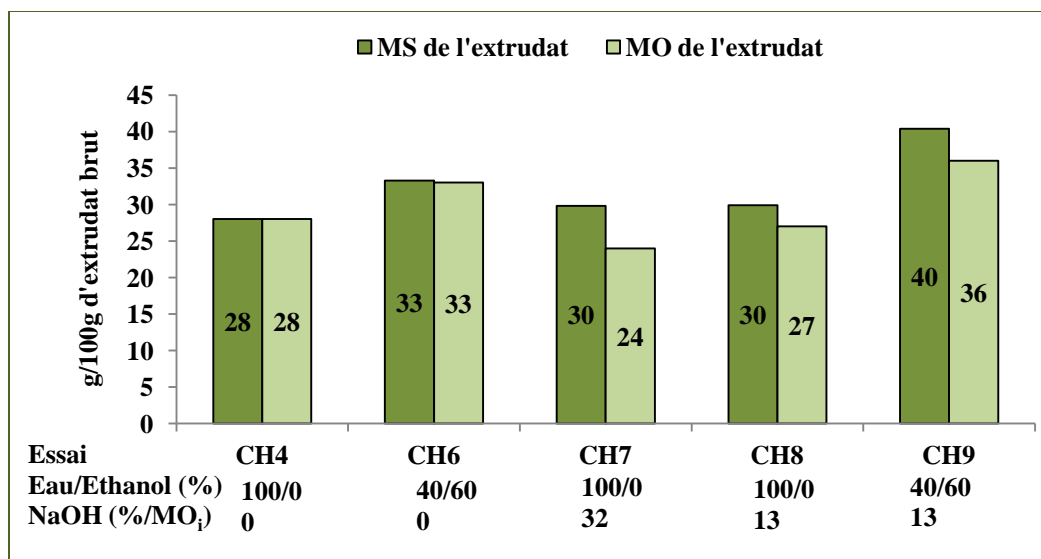


Figure III.6 : Teneurs en matières sèche et organique des extrudats pour des extractions en extrudeur bi-vis à 50 °C. Cas de la chènevotte

La séparation L/S plus efficace en présence d'éthanol, se traduit aussi par un rendement en matière organique extraite supérieure dans le filtrat brut que ce soit en absence ou en présence de réactif alcalin (Figure III.7). La matière organique, extraite par séparation L/S en extrudeur bi-vis, est ainsi comprise entre 7,5 et 13,9 % de la matière organique entrante.

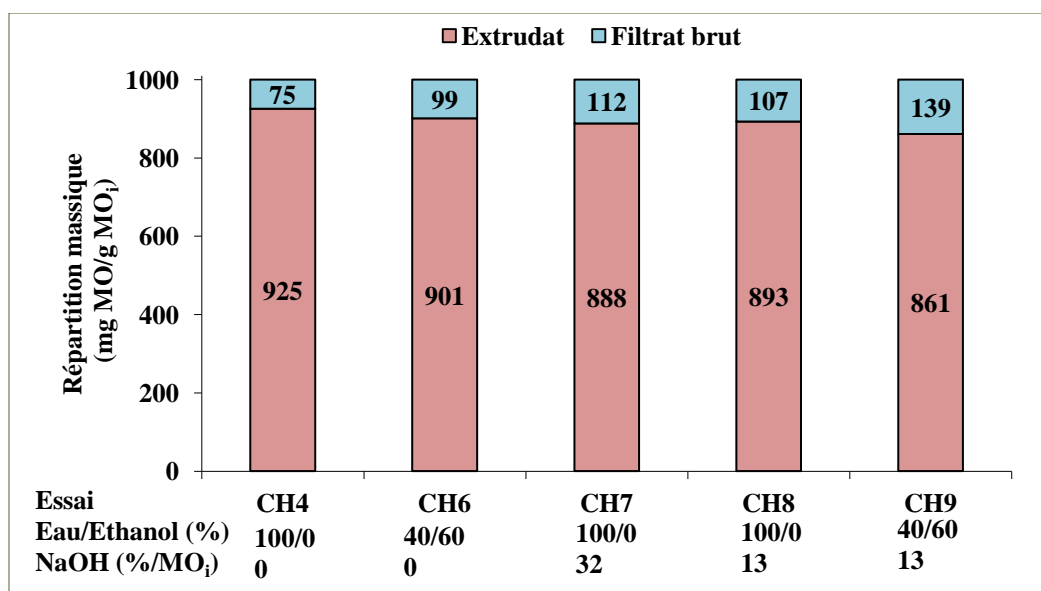


Figure III.7 : Influence du solvant sur la répartition de la matière organique en extracteur bi-vis à 50 °C. Cas de la chènevotte

Suite à la centrifugation, les teneurs en matière organique des filtrats clairs et des résidus solides dénommés « pieds » ont été évaluées (Figure III.8). Les extractions aqueuse ou hydro-alcoolique, sans réactif alcalin, conduisent à des rendements d'extraction faibles et équivalents, de l'ordre de 25 mgMO/gMO_i. Contrairement aux extractions batch, la polarité du solvant extracteur n'influence pas a priori les rendements d'extraction. Il en est de même pour la température, puisqu'une augmentation à 100 °C n'améliore pas le rendement. Ceci laisse supposer que l'extraction en extrudeur bi-vis de la chènevotte est soumise à une limitation diffusionnelle plus qu'à une limitation cinétique.

Pour un taux de NaOH de 13 %/MO_i, les rendements sont triplés (70 mgMO/gMO_i) et équivalents pour une extraction avec ou sans éthanol. Ils sont légèrement améliorés pour une teneur en NaOH supérieure. Augmenter le taux de réactif alcalin en milieu aqueux est synonyme d'une déstructuration chimique supérieure de la chènevotte, ce qui coïncide avec un bouchon dynamique moins résistant et une séparation liquide/solide légèrement moins efficace. L'addition du réactif alcalin, sous condition de contrainte mécanique de cisaillement (malaxeurs bilobes), permet d'améliorer la pénétration du solvant dans la matière végétale et donc de favoriser l'action chimique du réactif. L'introduction de la deuxième fraction de solvant, sans réactif, dans une zone de détente de la matière, permet d'extraire les molécules libérées par l'action du réactif alcalin juste avant leur séparation par pressage au niveau du contrefilet.

La diminution de la lubrification en présence de solvant éthanolique est synonyme d'une action déstructurante supérieure du contrefilet, et donc d'un entraînement supérieur de matière organique dans le filtrat brut sous forme de fines particules insolubles (Figure III.8b). Cette conclusion est aussi valable en extraction alcaline.

Les rendements en extractibles sont équivalents à ceux obtenus par macération (Figure II.17). Ainsi, une extraction en continu sous contrainte mécanique à 50 °C, pour un ratio L/S de 6 et pour une durée de 1 à 3 minutes, équivaut à une macération de 24 h, pour un ratio L/S bien supérieur (L/S = 16) et à température ambiante. Par contre, ces rendements ne représentent que le tiers des potentiels obtenus par extraction Fibertec à reflux, en 1h et pour un ratio L/S de 100.

Si on se réfère à l'hydrolyse aqueuse alcaline de référence en batch (20 °C, 24 h, L/S = 30, 480 % NaOH/MO_i) ou à l'étape alcaline de l'hydrolyse séquencée (30 °C, 18 h, L/S = 25, 100% NaOH/MO_i), le rendement en bi-vis en conditions alcalines représente respectivement seulement 10 % ou 33 % de ces derniers. Par contre, les conditions d'hydrolyse batch sont des

conditions analytiques extrêmes pour lesquelles la matière organique est quasi-intégralement dissoute par attaque chimique alcaline. Ces conditions opératoires ne sont absolument pas envisageables pour un développement de process industriel.

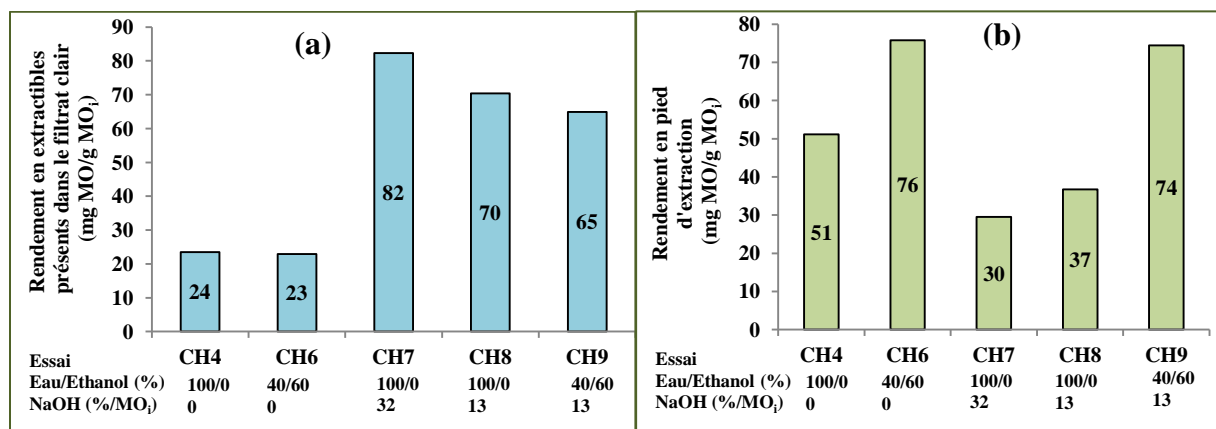


Figure III.8 : Rendements en extractibles dans le filtrat clair (a) et en pied d'extraction (b) à 50 °C par extraction en extrudeur bi-vis. Cas de la chènevotte

Les teneurs en polyphénols totaux des filtrats clairs ont été mesurées par un dosage de Folin-Ciocalteu (Figure III.9) et les teneurs en acides phénoliques ont été quantifiées par analyses HPLC (Figure III.10).

Notons préalablement que l'effet de l'augmentation de la température de 50 °C (0,6 mg d'EAG/gMO_i) à 100 °C (0,7 mg d'EAG/gMO_i) n'a pas d'impact sur l'extraction des composés phénoliques totaux, ce qui confirme l'absence de limitation cinétique pour l'extraction de la chènevotte.

A 50 °C, une augmentation du rendement en composés phénoliques est constatée pour un solvant éthanolique. La sélectivité du solvant hydro-alcoolique pour les polyphénols de chènevotte est donc confirmée dans le cas de l'extraction continue en extrudeur bi-vis. Cette valeur maximale obtenue en absence de réactif représente 33 % du potentiel en PP obtenu au Fibertec. La teneur en polyphénols des extraits est identique pour les deux techniques d'extraction : 10 %/MO_E. Donc, dans le cas des polyphénols, en absence de réactifs, la limitation diffusionnelle est confirmée.

L'efficacité du solvant hydro-alcoolique sur la solubilisation de composés phénoliques est aussi démontrée lors des extractions alcalines. Pour 13 % de NaOH/MO_i, le rendement en composés phénoliques totaux dans le solvant hydro-alcoolique (5,8 mg d'EAG/gMO_i) est 1,5 fois supérieur

à celui trouvé dans le solvant aqueux (4,0 mg d'EAG/gMO_i). Les différentes classes de molécules sont extraites a priori avec les mêmes rendements. Si les conditions opératoires permettent au solvant de pénétrer la structure de la matière végétale, ce dernier, extrait alors de manière indifférenciée les molécules qui lui sont affines. Comme dans le cas de la matière organique totale extraite, l'addition de NaOH permet de tripler le rendement d'extraction en polyphénols, tout en conservant une sélectivité identique à celle notée en absence de réactif.

En comparant les rendements en composés phénoliques, par extraction à l'eau et pour différentes concentrations en soude, on remarque qu'avec 13% NaOH/MO_i, 4,0 mg d'EAG/gMO_i sont extraits, ce qui est supérieur aux 2,2 mg d'EAG/gMO_i mesurés dans le cas d'une concentration de soude plus élevée (32 % NaOH/MO_i) et pour laquelle les rendements d'extraction sont pourtant légèrement améliorés. Les composés phénoliques semblent donc moins accessibles au solvant d'extraction. Cela peut être expliqué par l'effet savonneux apporté à la matière par la concentration élevée en soude. La matière glisse entre les vis et l'effet de la contrainte mécanique diminue au détriment de l'efficacité d'extraction des composés phénoliques.

Le rendement le plus élevé en composés phénoliques totaux est observé dans le cas de l'essai CH9 (5,8 mg d'EAG/gMO_i) en combinant les deux facteurs : soude et éthanol 60 %. La soude est diffusée par effet mécanique dans la chènevotte ; elle gonfle les parois végétales, plus particulièrement la structure cristalline de la cellulose, et rompt les liaisons hydrogène inter-moléculaires, ce qui aboutit à la libération des composés phénoliques. Ces derniers, plus facilement accessibles, sont alors solubilisés par leur solvant hydro-alcoolique de prédilection. Cette valeur obtenue par un simple passage de la matière végétale dans l'extracteur bi vis, représente 46 % du rendement en PP obtenu par hydrolyse alcaline en batch et pendant 24 h. Enfin, la teneur en polyphénols de cet extrait est de 10 %/MO_E tandis que pour l'hydrolyse alcaline, la pureté de ce dernier s'effondre à 1,5 %/MO_E. Dans l'hypothèse d'une purification ultérieure des extraits et, par exemple, d'une évaluation des propriétés antioxydantes, ce paramètre est fondamental.

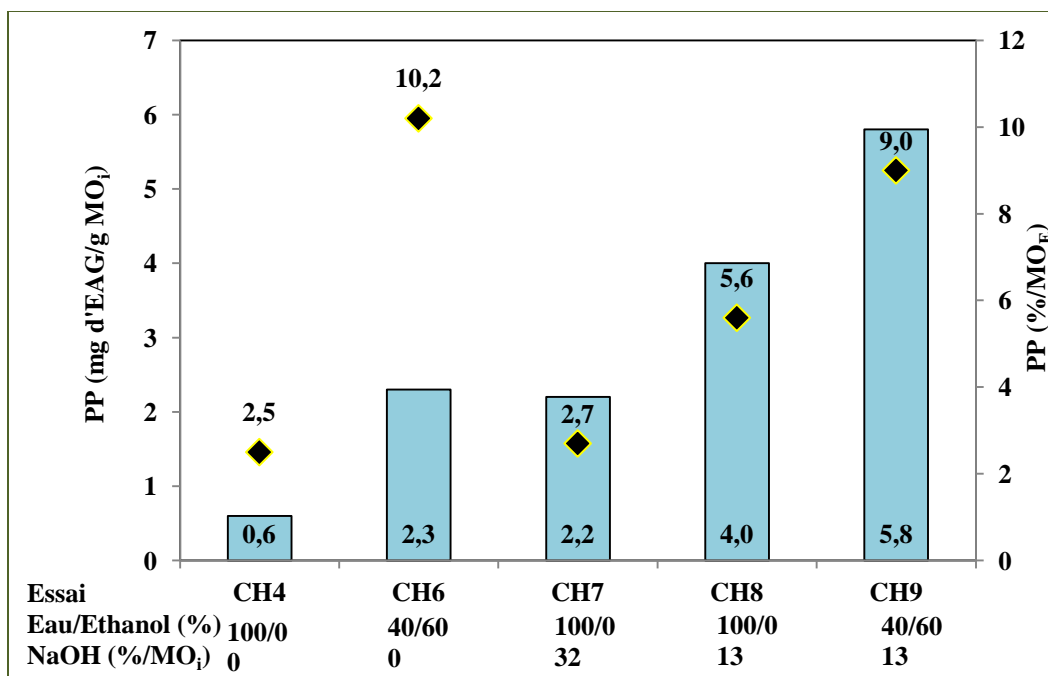


Figure III.9 : Rendements d'extraction en composés phénoliques totaux et teneurs en composés phénoliques des fractions extraites (♦) dans les filtrats clairs à 50 °C par extraction en extrudeur bi-vis. Cas de la chènevotte

Parmi les molécules analysées, l'ApC est la molécule la plus abondante, suivie par l'AF et ensuite par la Van. La tendance pour les rendements en composés phénoliques des différents essais est comparable à celle observée pour les rendements en PP.

L'augmentation de la température de 50 °C à 100 °C n'a pas d'effet positif significatif.

Les rendements obtenus en extrudeur bi-vis sans réactif (L/S = 6, 50 °C, 2 min) sont similaires pour les deux solvants et, comparables aux valeurs obtenues en extraction batch par macération (L/S = 16, 20 °C, 24 h). Ainsi, un procédé d'extraction bi-vis permet de minimiser les ratios L/S et les durées d'extraction, pour conduire à des rendements équivalents. Néanmoins, ces valeurs demeurent faibles dans l'absolu et bien inférieures aux rendements de référence obtenus en Fibertec (L/S = 100, 100 °C, 1 h), avec un facteur 10 pour le solvant aqueux et un facteur 4 pour le solvant hydro-alcoolique. Extraire les acides phénoliques sans introduire un réactif chimique agissant sur la structure du végétal, même sous contrainte thermo-mécanique, n'est donc pas concluant en terme de rendement d'extraction.

En présence d'un réactif alcalin, les teneurs en AF et Van sont équivalentes (1,7 %/PP) quels que soient la concentration en NaOH ou le solvant utilisé, ce qui montre l'absence de limitation

diffusionnelle. Ce n'est pas le cas pour l'ApC pour lequel le solvant hydro-alcoolique semble être le plus efficace en extracteur bi-vis.

Le rendement en composés phénoliques en milieu aqueux obtenu avec 13 % NaOH/MO_i est supérieur d'un facteur 2 à celui trouvé dans le cas d'une concentration de soude de 32 % NaOH/MO_i.

Le rendement est optimal pour la combinaison solvant hydro-alcoolique-NaOH qui permet d'extraire 2 fois plus d'acides phénoliques comparativement au solvant aqueux. La soude est diffusée par effet mécanique dans la chènevotte, elle gonfle les parois végétales et rompt une partie des liaisons chimiques retenant les acides *p*-coumarique et férulique. Les composés phénoliques sont libérés et extraits directement par le solvant hydro-alcoolique pour lequel leur affinité est avérée. Bien évidemment, ces rendements demeurent inférieurs d'un facteur 2 à 4, selon la molécule, par rapport à l'hydrolyse alcaline en batch. Néanmoins, cette différence est plus que satisfaisante puisqu'en extraction en extrudeur bi-vis, la concentration en soude est 45 fois inférieure à celle utilisée pour l'hydrolyse alcaline en batch. De plus, le faible ratio L/S minimise la consommation en solvant ce qui représente un avantage économique et environnemental. Nous pouvons noter qu'un ratio L/S de 6 est même inférieur à la capacité d'absorption commerciale de 10 L/kg énoncée pour le lot de chènevotte.

Pour l'ensemble des résultats illustrés dans la Figure III.10, le rendement en ApC est bien supérieur à celui en AF. Le ratio ApC/AF est compris entre 6 et 18 en passant de l'essai CH4 à l'essai CH9. Ce dernier avait été évalué à 12 pour l'hydrolyse alcaline en batch. Cela reflète qu'en bi-vis, il est possible d'orienter la sélectivité d'extraction entre les 2 acides phénoliques, en fonction des conditions opératoires appliquées.

La caractérisation analytique des types de liaisons existant entre les acides férulique et *p*-coumarique et la structure lignocellulosique avait démontré que l'acide férulique était lié essentiellement par des liaisons éthers, difficilement hydrolysables, et que l'acide *p*-coumarique était lié à parts égales par des liaisons éthers et esters, plus sensibles à des attaques chimiques. Dans le cas d'une extraction aqueuse, le fait de travailler sous contrainte mécanique et à faible température a permis, avec un temps de séjour de la matière dans l'extrudeur de l'ordre de 1 à 3 minutes, d'atteindre 22 % et 32 % des acides férulique et *p*-coumarique présents. L'introduction d'une quantité de NaOH de 13 %/MO_i serait suffisante pour hydrolyser la totalité des liaisons esters retenant l'acide férulique et la moitié des liaisons esters liant l'acide *p*-

coumarique, donc la rupture du complexe cellulose-hémicelluloses-lignines. Cependant, puisqu'en mettant en œuvre une quantité de soude équivalente pour un solvant hydro-alcoolique, les quantités d'acides *p*-coumarique et férulique extraites augmentent fortement, il est possible de conclure que peu de NaOH suffit à hydrolyser un grand nombre de liaisons chimiques, si tant est que le réactif est diffusé de manière efficace dans la matière végétale. Le choix du solvant extractant est alors défini par l'affinité des molécules d'intérêt pour ce dernier. L'extraction hydro-alcoolique basique permet d'atteindre 33 % du potentiel en acide férulique et 51 % du potentiel en acide *p*- coumarique.

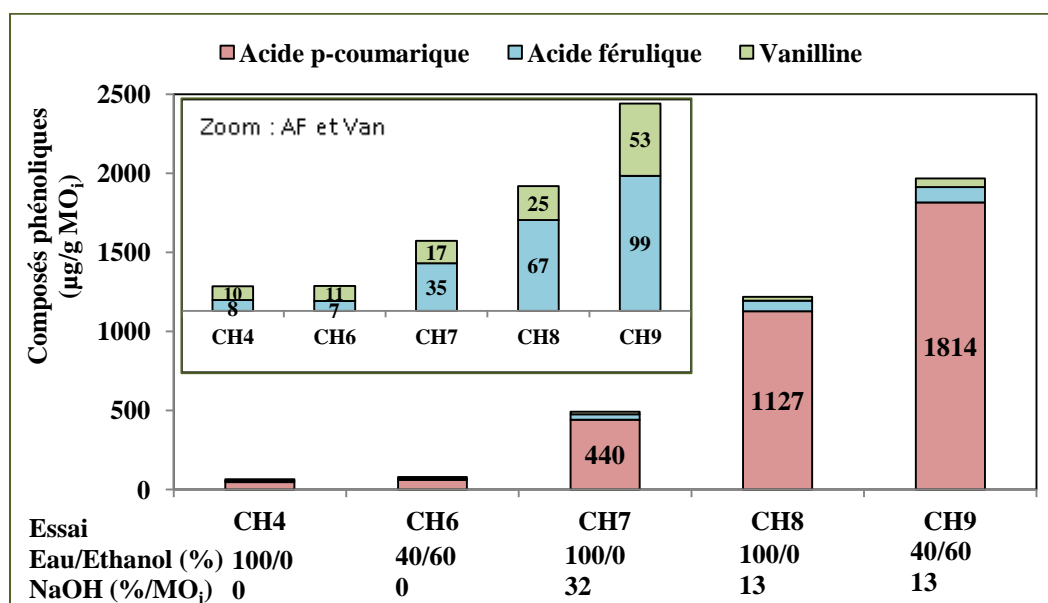


Figure III.10 : Rendements en composés phénoliques dans les filtrats clairs obtenus par extraction à 50 °C en extracteur bi-vis. Cas de la chènevotte

L'utilisation de l'extrudeur bi-vis démontre ici tout son intérêt en optimisant la diffusion du réactif dans la matrice végétale et en permettant de solubiliser les molécules libérées avec le minimum de solvant. D'autre part, il est judicieux, en revenant au protocole expérimental de l'hydrolyse alcaline, de considérer que la diminution de la concentration en soude et l'utilisation du solvant hydro-alcoolique à la place de l'eau serait une bonne alternative pour une meilleure efficacité d'extraction des composés phénoliques.

III.1.1.3. Caractérisation physico-chimique des extrudats

Afin d'évaluer le niveau de déstructuration de la matière et d'étudier sa composition en molécules extractibles résiduelles, nous avons choisi d'analyser plus en détails les extrudats des essais CH8 et CH9.

Les résultats ADF-NDF obtenus pour les deux extrudats sont équivalents.

Les taux d'hémicelluloses, de lignine et de cellulose dans les essais démontrent une faible déstructuration de la matière (extrudat) comparativement à la chènevotte initiale. Peu de lignine et d'hémicelluloses ont été extraites lors de l'extrusion en bi-vis. Une faible variabilité de la répartition des fractions pariétales est observée (Figure III.11) avec une légère augmentation de la fraction cellulosique.

La quantité d'extractibles NDF est supérieure dans le cas de l'extrudat hydro-alcoolique ce qui confirme l'intérêt d'une extraction éthanolique alcaline.

Tableau III.4 : Taux de matière sèche, de matière minérales et caractérisation chimique par la méthode Van Soest and Wine des extrudats des essais CH8 et CH9

	Chènevotte	Essai CH8	Essai CH9
Matière sèche	91,7 ± 0,03 %	100 %	100 %
Matière minérale	2,8 ± 0,1 %	8,7 % (n = 2)	10,0 % (n = 2)
Résidu NDF	86,8 ± 0,1 %	74,1 ± 0,7 %	70,2 ± 0,1 %
Extractible NDF	13,2 ± 0,1 %	25,9 ± 0,7 %	29,8 ± 0,1 %
Résidu ADF	68,6 ± 0,5 %	60,8 ± 0,1 %	56,2 ± 0,3 %
Extractible ADF	31,4% ± 0,5 %	39,2 ± 0,1 %	43,9 ± 0,3 %
Taux de cellulose	50,6 ± 3,1 %	45,2 ± 0,1 %	42,5 ± 0,2 %
Taux de Lignine	18,0 ± 2,8 %	15,6 ± 0,04 %	13,6 ± 0,3 %
Taux d'hémicelluloses	18,2 ± 0,5 %	13,3 ± 0,6 %	14,1 ± 0,5 %

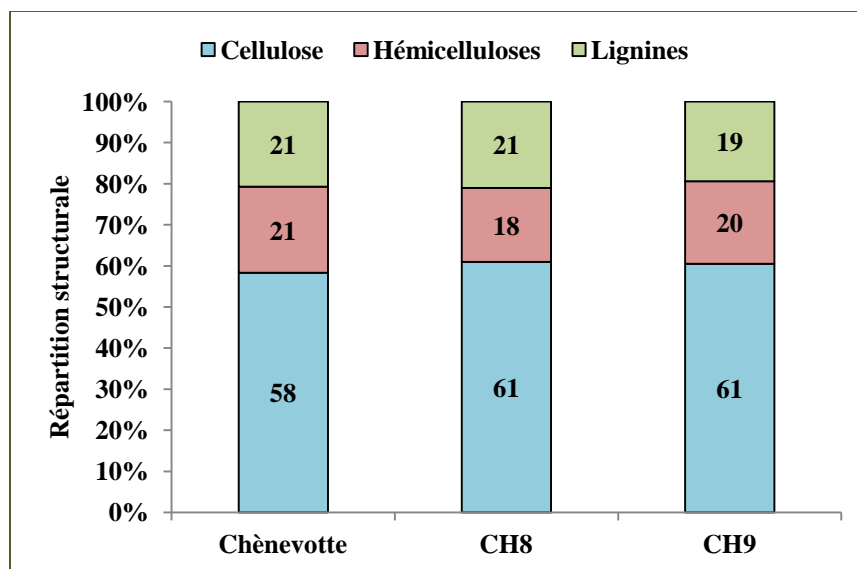


Figure III.11 : Répartition massique en lignines, cellulose et hémicelluloses dans la fraction pariétale des extrudats

L'extractabilité par un solvant aqueux, hydro-alcoolique ou éthanolique a été ensuite étudiée au Fibertec pour les deux extrudats. Dans les deux cas, l'eau est le solvant le plus efficace pour extraire les molécules libres présentes dans les extrudats. Les rendements en extractibles sont supérieurs pour l'essai CH9 (Figure III.12). Le solvant hydro-alcoolique combiné à des conditions alcalines sous contrainte thermo-mécanique a agi sur la matière première en permettant de libérer une grande quantité de matière organique. Même si ces molécules n'ont pas pu être extraites lors la séquence d'extraction par extrusion, elles restent sous forme libre dans la structure de l'extrudat et sont facilement extractibles par un tiers solvant polaire. L'efficacité des trois solvants d'extraction suit la même tendance que celle qui a été présentée tout au long de notre étude dans le cas de la chènevotte. La matière organique extractible est plus soluble dans le solvant le plus polaire.

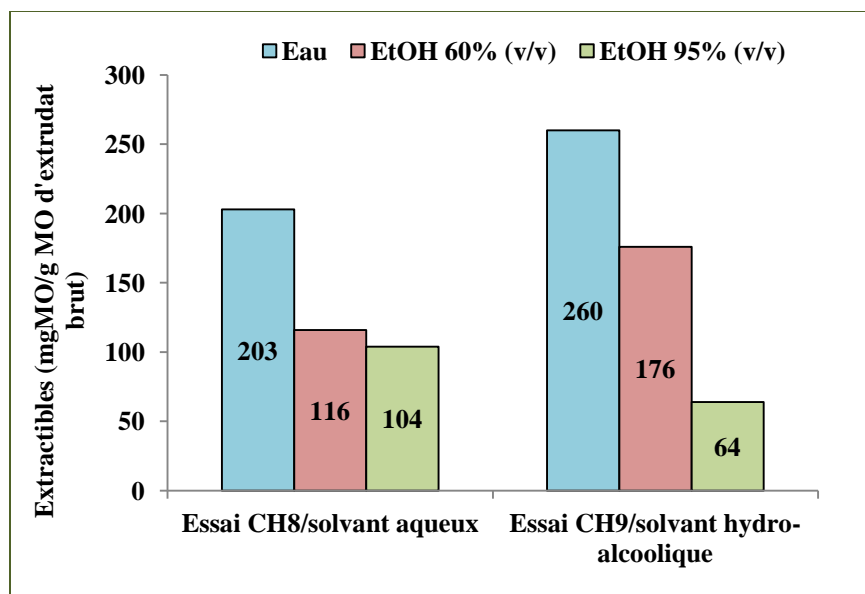


Figure III.12 : Rendements en extractibles des extrudats exprimés en mg MO/g MO d'extrudat brut. Cas de la chènevotte

Dans le cas de l'essai CH8, les rendements en extractibles dans l'éthanol 60 % et l'éthanol 95 % sont comparables. Le rendement le plus élevé (182 mg MO/g MO_i dans l'eau) est 2,5 fois supérieur au rendement en extractibles dans le filtrat clair (70 mg MO/g MO_i) (Figure III.13).

Dans le cas de l'essai CH9, le solvant aqueux extrait 33 % plus d'extractibles que le solvant hydro-alcoolique qui à son tour dépasse l'extraction éthanolique de 70 %. Une extraction Fibertec à l'eau de l'extrudat permet d'extraire 224 mg MO/g MO_i ce qui représente 3,4 fois la quantité d'extractibles présente dans le filtrat clair (65 mg MO/g MO_i). Un simple lavage à reflux à l'eau de l'extrudat coïncide donc avec une extraction du quart de la matière organique de ce dernier.

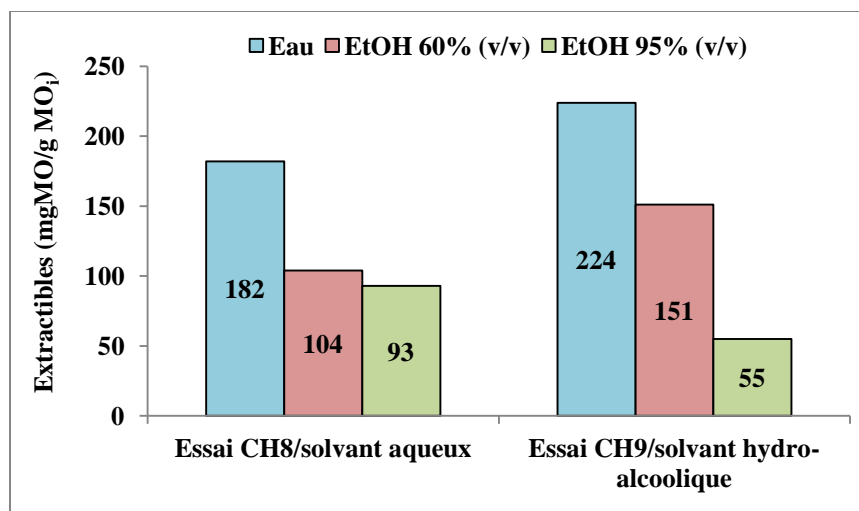


Figure III.13 : Rendements en extractibles des extrudats exprimés en mg MO/g MO_i. Cas de la chènevotte

Il est possible d'émettre l'hypothèse que le liquide présent dans le pied d'extraction est, dans sa composition chimique, équivalent au filtrat clair. Un lavage du pied par un solvant adéquat tel que l'eau pourrait augmenter la quantité de matière organique soluble extractible. Une fois cette simulation de calcul effectuée, nous avons pu conclure que la fraction de matière organique libre contenue dans le culot représente moins de 5 % de celle présente dans le filtrat clair. Cette sortie du procédé peut donc être négligée.

En additionnant les rendements en extractibles issus du filtrat clair et de l'extrudat/solvant aqueux, on obtient un rendement en extractibles de 289 mg MO/g MO_i. Cette valeur est bien supérieure au potentiel extrait de la chènevotte au Fibertec (82 mg MO/g MO_i) ce qui est expliqué par l'action du réactif. Par contre elle est plus de 2 fois inférieure au rendement en extractibles de l'hydrolyse alcaline en batch effectuée dans des conditions analytiques extrêmes (20 °C, 24 h, L/S = 30, 480 %NaOH/MO_i). Cela montre qu'une étape supplémentaire de post-traitement des extrudats semble être une des possibilités pouvant améliorer notre rendement global d'extraction.

Parmi les extractibles, les polyphénols sont présents en quantités équivalentes dans les deux extrudats pour un même solvant d'extraction. L'efficacité du solvant aqueux est équivalente à celle du solvant hydro-alcoolique (Figure III.14). La valeur maximale de 6,6 mg MO/g MO_i est supérieure au rendement en polyphénols dans le filtrat clair (4,0 mg MO/g MO_i pour CH8 et 5,8

mg MO/g MO_i pour CH9). En considérant le cas de l'extrudat CH9, et en additionnant les rendements en PP dans le filtrat clair et l'extrudat, une valeur de 12,4 mg MO/g MO_i est obtenue. Elle est comparable au potentiel en PP évalué au cours de l'hydrolyse alcaline en batch (12,6 mg MO/g MO_i). Dans le cas de l'essai CH8, elle en est très proche (10,6 mg MO/g MO_i). La contrainte mécanique, appliquée en milieu alcalin polaire provoque la déstructuration réactive de la matière première. Une partie des molécules est obtenue par séparation liquide/solide dans l'extrudeur. Les autres molécules, libérées mais retenues dans l'extrudat, sont disponibles pour une seconde étape d'extraction qui serait hautement favorable à une augmentation significative des rendements en polyphénols.

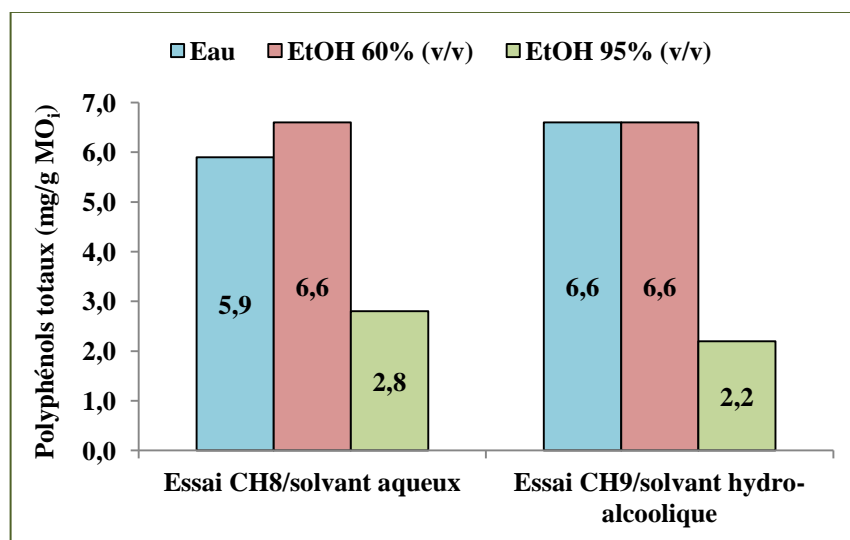


Figure III.14 : Rendements en polyphénols extraits des extrudats exprimés en mg MO/g MO_i. Cas de la chènevotte

Parmi les PP analysés, l'ApC reste le plus abondant (Tableau III.5) qu'il soit extrait à l'eau ou à l'éthanol 60 %. Les rendements en ApC et en Van sont supérieurs à ceux mesurés dans le filtrat clair.

Les teneurs maximales en composés phénoliques, obtenues en combinant les deux étapes d'extraction : extrudeur bi-vis et post-traitement des extrudats par lavage sous reflux, sont présentées dans la Figure III.15. Le lavage des extrudats à reflux par un solvant polaire a été effectué dans des conditions analytiques favorisant l'accessibilité et la solubilisation d'un maximum de molécules : reflux, 1 h, L/S=100. Cette technique conduit au potentiel en composés phénoliques pouvant être extraits et solubilisés à partir des extrudats. Ce potentiel comprend les

quantités résiduelles en composés phénoliques libérés par action chimique de la soude combinée à l'effet mécanique de déstructuration. Le lavage a permis, dans le cas de la chènevotte, de doubler les quantités d'ApC et de quadrupler les quantités de Van. Le potentiel défini par hydrolyse alcaline dure est ainsi dépassé pour ces 2 familles de molécules en sommant les valeurs issues de l'extraction bi-vis et du lavage à reflux. Par contre, la quantité d'acide férulique dosée suite au lavage des extrudats est faible quel que soit le solvant. Ainsi, l'extraction alcaline en extrudeur bi-vis, dans les conditions choisies, conduit à l'hydrolyse préférentielle des liaisons ester. Les liaisons éther liant l'acide férulique ne sont que partiellement attaquées. La deuxième étape d'extraction à reflux en milieu alcalin faible peut contribuer à l'extraction réactive des molécules d'acide *p*-coumarique sans pour autant permettre de poursuivre l'hydrolyse des liaisons éthers pour lesquelles des conditions chimiques plus dures seraient nécessaires.

Tableau III.5 : Rendements en composés phénoliques ($\mu\text{g/g MOI}$) dans les filtrats clairs et extraits des extrudats. Cas de la chènevotte

Acide férulique					Acide <i>p</i> -coumarique				Vanilline				
Filtrat clair	Extrudat				Filtrat clair	Extrudat				Filtrat clair	Extrudat		
	Eau	Ethanol 60 %	Ethanol 95 %			Eau	Ethanol 60 %	Ethanol 95 %			Eau	Ethanol 60 %	Ethanol 95 %
CH8	67	29	24	14	1127	1971	2073	1208		25	116	170	109
CH9	99	18	19	Traces	1814	2373	1944	826		53	226	215	142

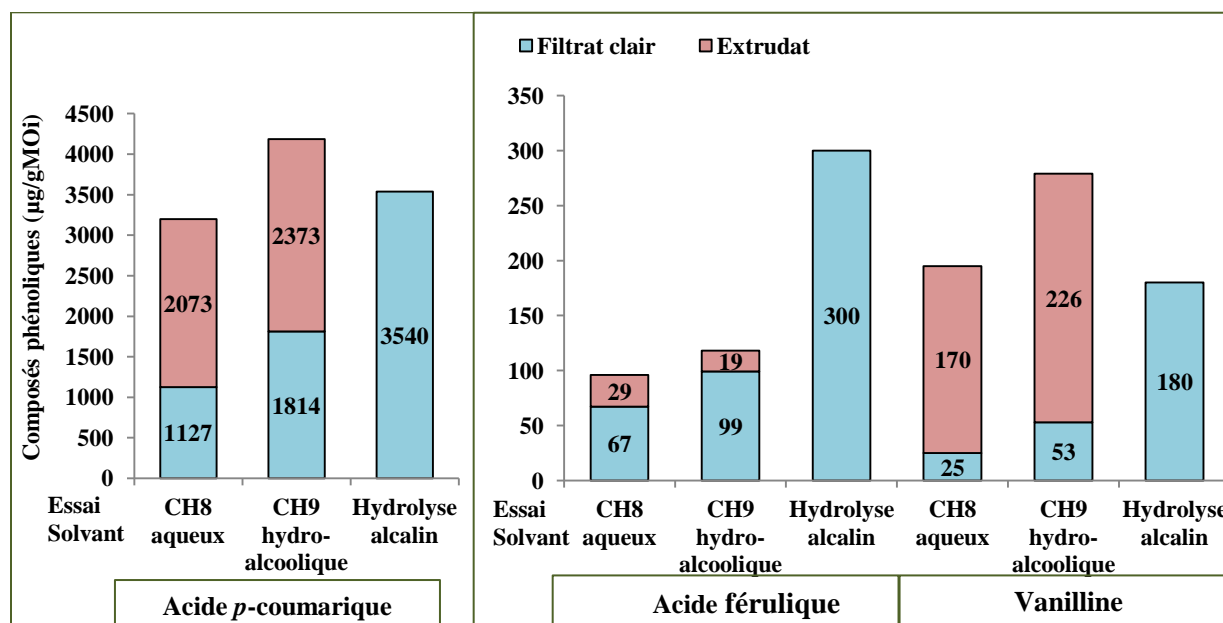


Figure III.15 : Rendements en composés phénoliques dans les différentes sorties de l'extraction en extrudeur bi-vis. Comparaison avec l'hydrolyse alcaline en batch. Cas de la chènevotte

L'évaluation du potentiel en extractibles, PP et composés phénoliques des extrudats permet de conclure qu'un premier passage extractif en extrudeur bi-vis coïncide avec une déstructuration réactive de la matière. La limite diffusionnelle est alors grandement levée pour une deuxième étape d'extraction qui semble être une des possibilités pouvant améliorer nos rendements. Une autre perspective supplémentaire peut être envisagée : le broyage de la chènevotte avant son introduction dans l'extracteur bi-vis. Cette étape permettrait d'augmenter la surface spécifique du solide pour une diffusion efficace du réactif alcalin. En effet, sans broyage préalable, les disques malaxeurs sont mis à contribution à la fois pour le cisaillement de la matière première et pour le mélange entre cette dernière et le réactif alcalin. En broyant en amont de l'extrusion, les malaxeurs joueraient plus efficacement leur rôle de mélange sous contrainte ce qui favoriserait l'action chimique du réactif et augmenterait la diffusion du solvant dans la matrice végétale.

Nous avons constaté que les rendements en ApC et en Van étaient supérieurs à ceux obtenus par hydrolyse alcaline. Nous avons alors pu conclure qu'un procédé en deux étapes : 1) extraction en extrudeur bi-vis dans les conditions des essais CH8 ou CH9 et 2) simple lavage à chaud avec un solvant polaire pourrait être une des voies concluante pour maximiser l'extraction des acides *p*-coumariques.

III.1.2. La poudre organique

L'extraction en bi-vis de la poudre organique a été menée avec le même objectif : extraire les composés phénoliques par la mise en œuvre de l'extrudeur bi-vis comme outil original d'extraction et de séparation liquide/solide.

III.1.2.1. Faisabilité de l'extraction liquide/solide en extraction par extrusion bi-vis

Pour la poudre organique, 3 profils de vis distincts ont été testés. Les zones de convoyage et d'extraction liquide/solide (modules 1-5) ont été conservées à l'identique de celle mise en œuvre pour la chènevotte. Les profils ont différé au niveau de la zone de séparation liquide/solide (module 7) et plus précisément au niveau du contrefilet. En effet, la poudre organique étant

moins fibreuse que la chènevotte, une optimisation au niveau des éléments restrictifs a été nécessaire pour améliorer la séparation liquide/solide. Les profils testés et les conclusions des essais sont exposés dans le Tableau III.6. Les conditions de débit solide (2,5 kg/h), de ratios liquide/solides : $(L/S)_1 = 1,5$ et $(L/S)_2 = 4,5$ (eau), de vitesse de vis (200 tpm) et de température (50 °C) avaient été choisis a priori et sont considérés comme des constantes pour ces essais de faisabilité.

Avec un contrefilet de longueur et pas de vis intermédiaire (profil 4), la matière végétale est bien défibrée à la sortie de l'extracteur et la séparation liquide/solide est efficace. Ce dernier profil a été retenu pour l'ensemble des essais d'extraction ultérieurs (Figure III.16).

Tableau III.6 : Profils de vis testés pour l'extraction aqueuse en extrudeur bi-vis des composés phénoliques de la poudre organique

Profil	Contrefilet		Conclusions
	Longueur (mm)	Pas de vis	
2	12,5	-25	Séparation liquide/solide médiocre, déstructuration insuffisante
3	50,0	-25	Blocage de l'extrudeur : contrainte trop importante
4	25,0	-16	Séparation liquide/solide et déstructuration correctes

Les paramètres étudiés lors de ces essais sont aussi, dans le cas de la poudre organique, la température et le solvant extractant.

Les conditions opératoires, les débits entrants des solvants et de la matière végétale, les débits sortants d'extrudat et de filtrats bruts et le filtrat clair et le pied de centrifugation obtenus sont rassemblés dans le Tableau III.7.

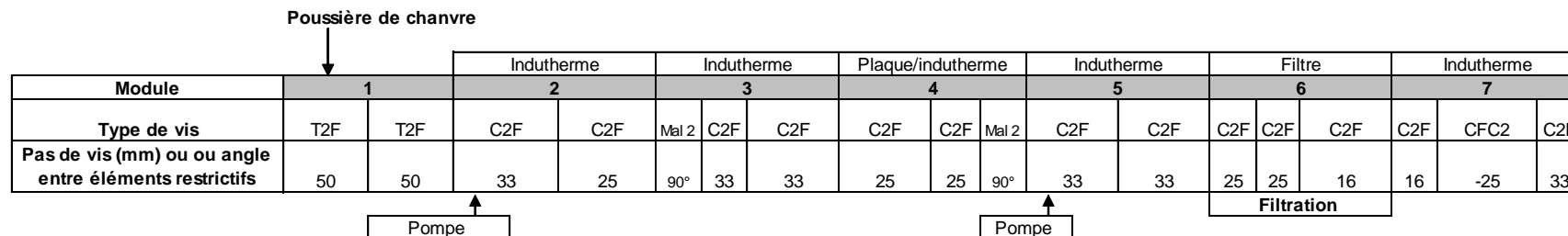
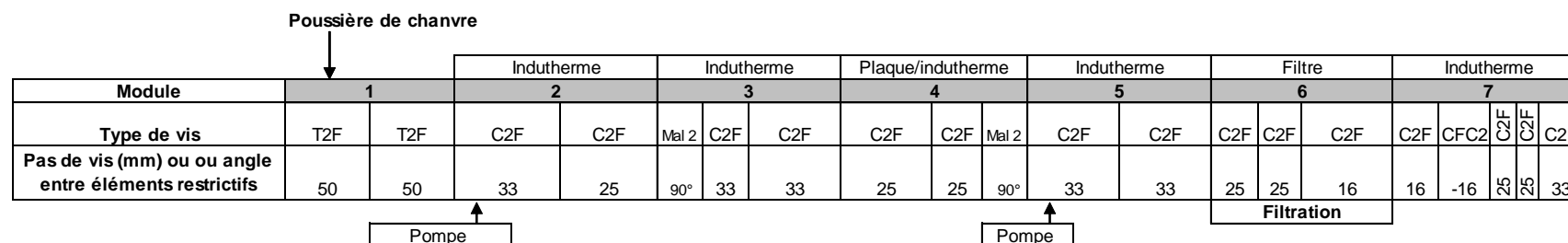
Profil N°3 :**Profil N°4 :**

Figure III.16 : Profils de vis pour l'extraction des composés phénoliques de la poudre organique en extrudeur bi-vis BC21. Types de vis : T2F : double-filet trapézoïdal ; C2F : double-filet conjugué ; Mal2 : disques malaxeurs bilobes ; CFC2 : contre-filets en double-filet conjugué

La poudre organique a été extraite sans broyage préalable. A noter que lors de cette campagne d'extraction, le comportement de la matière première dans le doseur nous a amenés à corriger le débit entrant. En effet, la morphologie de la poudre organique (Figure II.10) est telle qu'une agglomération des fibres fines, un des constituants du lot de la poudre organique, a été observée dans le doseur. Formant des « pelotes » de différentes tailles, ce phénomène a conduit à la surestimation du débit solide réellement introduit. De manière à pallier la dérive du doseur, nous avons corrigé les bilans matières (Tableau III.7). La quantité de matière organique entrante a été calculée comme étant la somme des quantités de matière organique sortante, déterminées expérimentalement. Les débits entrants recalculés, compris entre 1,2 et 1,6 kg/h, sont ainsi bien inférieurs à 2,5 kg/h, valeur de consigne envisagée. Les ratios liquide/solide réels ont donc été recalculés en conséquence et sont alors compris entre 9 et 13. De la même manière, les % NaOH/MO_i initialement envisagés à 10 % ou 25 % sont doublés d'un point de vue expérimental : 20 % ou 50 %/MO_i.

Tableau III.7 : Conditions opératoires et débits massiques entrants et sortants pour les essais d'extraction de la poudre organique en extrudeur bi-vis BC21

				Solvant		Débit solide introduit (kg/h)			Débit liquide introduit (kg/h)	
Essai	L/S	T (°C)	Couple moteur	eau/Ethanol	%NaOH/MO _i	Brut	Sec	Organique	L1	L2
P4	9,7	50	10-17	100/0	0	1,54	1,39	1,20	3,75	11,25
P5	9,4	100	8-0	100/0	0	1,60	1,44	1,25	3,75	11,25
P6	13,2	50	17-22	40/60	0	1,19	1,07	0,93	3,94	11,75
P7	10,0	50	0	100/0	53,7	1,49	1,34	1,16	3,75	11,25
P8	9,2	50	0	100/0	20,0	1,62	1,46	1,26	3,80	11,20
P9	9,5	50	0-9/11	40/60	21,1	1,61	1,44	1,25	3,97	11,27

Essai	Débit extrudat (kg/h)			Débit filtrat (kg/h)						
	Brut	Sec	Organique	Total brut	Clair brut	Clair -Sec	Clair-Organique	Pied brut	Pied -Sec	Pied -Organique
P4	1,56	0,88	0,83	14,95	13,18	0,123	0,097	1,71	0,367	0,278
P5	1,37	0,93	0,87	14,67	12,89	0,131	0,103	1,66	0,368	0,274
P6	1,16	0,55	0,51	15,43	13,64	0,055	0,047	1,81	0,466	0,365
P7	3,37	1,18	0,78	12,01	10,33	0,650	0,186	1,37	0,368	0,194
P8	2,32	0,96	0,83	12,83	11,28	0,406	0,189	1,62	0,400	0,243
P9	1,62	0,95	0,81	14,99	13,28	0,309	0,151	1,39	0,453	0,293

Conditions opératoires : N = 200 tpm, profil N°4, durée de l'extraction = 15 min, répétition extraction n = 1

Tableau III.8 : Rendements d'extraction en molécules d'intérêts par extraction en extrudeur bi-vis. Cas de la poudre organique

					Extrudat	Pied	Filtrat								
	T (°C)	Couple moteur	% eau/ Ethanol	%NaOH/ MO _i	Rendement (mg MO/ gMO _i)	Rendement (mg MO/ gMO _i)	Matière organique (mg MO/g MO _i)	PP (mg/g MO _i)	PP/MO _E (%)	AF (µg/ gMO _i)	AF/PP (%)	Ap C (µg/ gMO _i)	Ap C/PP (%)	Van (µg/ gMO _i)	Van/PP (%)
P4	50	10-17	100/0	0	688,4	231,3	80,4	3,7	4,6	0	0,0	0	0	0	0
P5	100	8-0	100/0	0	698,3	219,4	82,3	3,6	4,3	0	0,0	0	0	0	0
P6	50	17-22	40/60	0	554,9	393,9	51,2	3,6	7,1	3,5	0,1	37	1,0	2,4	0,1
P7	50	0	100/0	53,7	673,5	166,5	160,1	9,2	5,7	80,0	0,9	538	5,9	39,0	0,4
P8	50	0	100/0	20,0	658,3	192,2	149,5	8,2	5,5	82,0	1,0	558	6,8	28,0	0,3
P9	50	0-9/11	40/60	21,1	645,0	234,2	120,9	9,0	7,4	94,7	1,1	1150	12,8	52,0	0,6
Hydrolyse alcaline	20	-	100/0	480	-	-	973	16,8	-	160	-	950	-	100	-
AP libres	Reflux	-	-	-	-	-	-	2,3	-	21	-	202	-	-	-
AP/liaison ester	30	-	100/0	100	-	-	-	5,0	-	38	-	700	-	-	-
AP/liaison éther	87	-	100/0	-	-	-	-	5,2	-	101	-	98	-	-	-

La Figure III.17 montre les différences d'aspect morphologique des produits issus de l'extraction de la poudre organique par extrusion bi-vis sous différentes conditions opératoires.

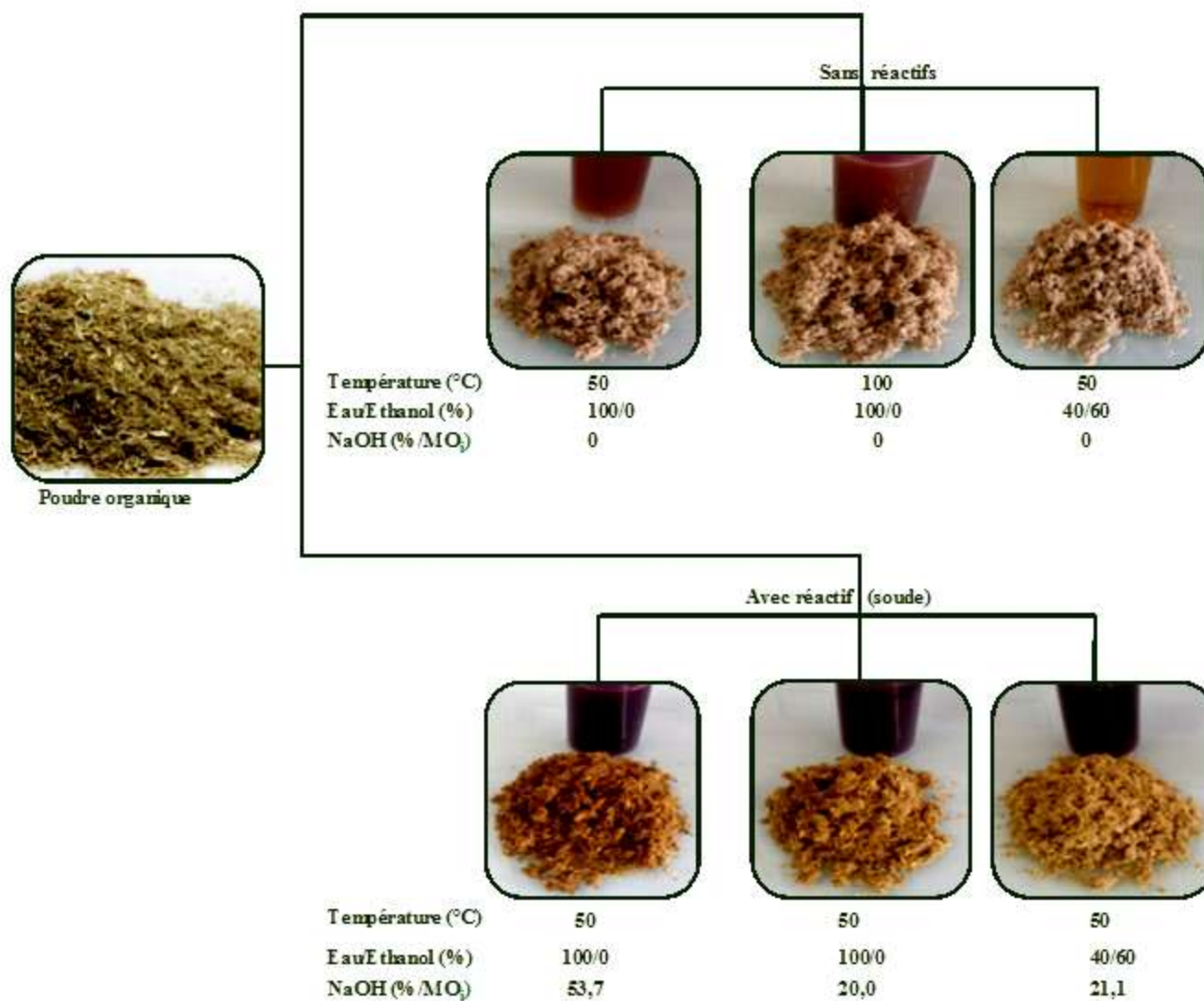


Figure III.17 : Aspect morphologique des extrudats et filtrats clairs issus de l'extraction de la poudre organique en extrudeur bi-vis

III.1.2.2. Influence du solvant et de la température sur l'extraction des composés phénoliques

Comme dans le cas de la chènevotte, l'addition d'éthanol au solvant d'extraction diminue le caractère lubrifiant. De ce fait, le passage du solide à travers le contrefilet et donc la séparation liquide/solide s'avèrent plus difficiles ce qui se reflète sur la valeur du couple moteur qui est plus élevée dans le cas du solvant hydro-alcoolique.

Les teneurs en matière sèche et matière organique des extrudats exprimées en g/100g d'extrudat brut traduisent l'efficacité de la séparation liquide/solide (Figure III.18). Les teneurs obtenues pour le solvant aqueux à 100 °C (64 g MO/100g d'extrudat brut) sont légèrement supérieures à celles obtenues à 50 °C (53 g de matières organiques/100g d'extrudat brut). En présence du réactif alcalin, l'efficacité du pressage diminue à cause de l'effet de déstructuration de la matière végétale. Plus la quantité de NaOH additionnée augmente, plus l'attaque chimique de la matière est accentuée. Une extraction hydro-alcoolique alcaline conduit à une séparation liquide/solide très efficace avec un extrudat largement appauvri en filtrat résiduel.

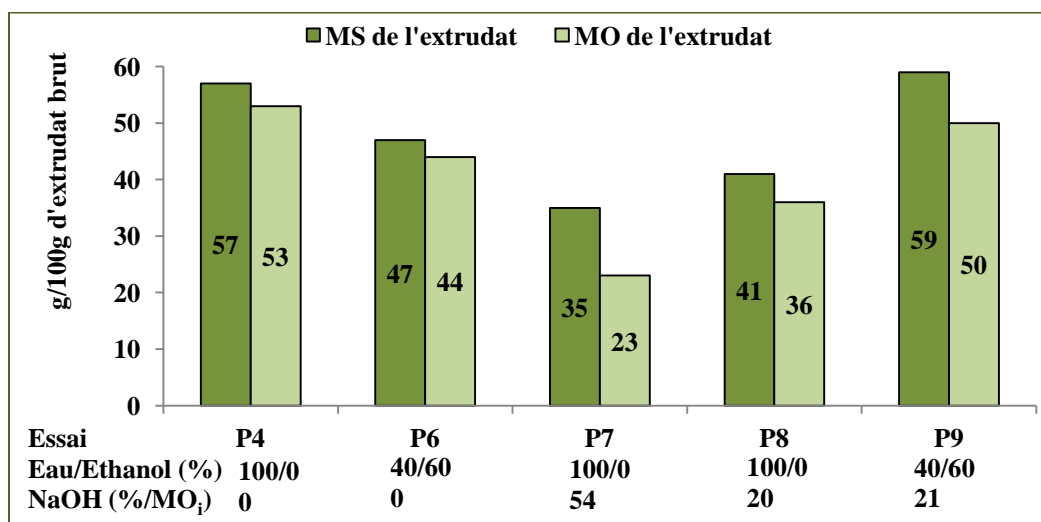


Figure III.18 : Teneurs en matières sèche et organique des extrudats pour des extractions en extrudeur bi-vis à 50 °C. Cas de la poudre organique

Comparables à différentes températures (50 et 100 °C) et pour différentes concentrations en soude (20 et 54 %/MO_i), les rendements en matière organique extraite dans le filtrat brut reflètent une meilleure efficacité de séparation liquide/solide dans le cas du solvant hydro-

alcoolique. Il atteint quasi 50 % en absence de réactif alcalin (Figure III.19), conditions pour lesquelles la lubrification dans le contrefilet est minimale.

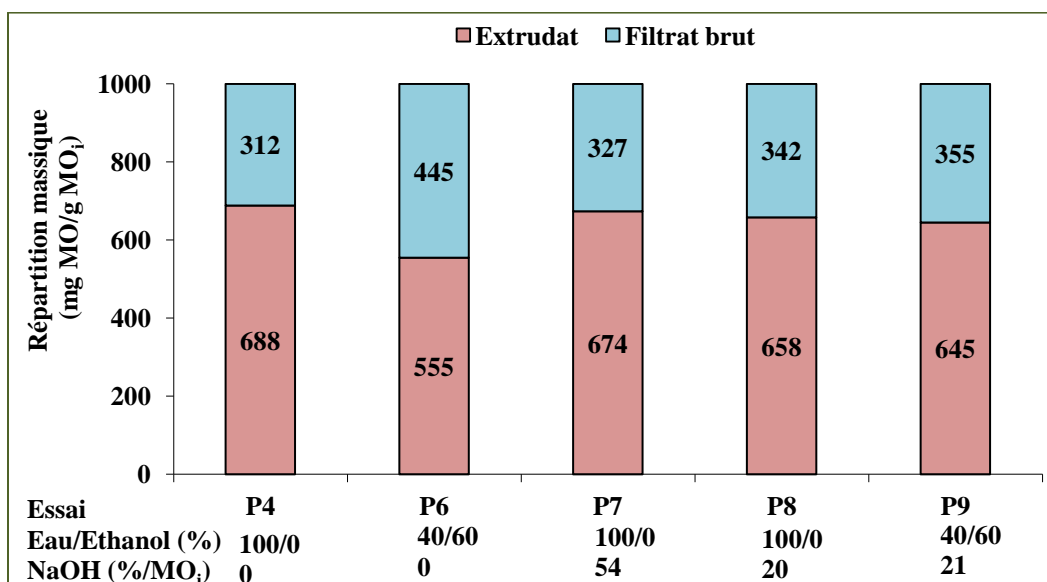


Figure III.19 : Influence du solvant sur la répartition de la matière organique en extracteur bi-vis à 50 °C. Cas de la poudre organique

Suite à la centrifugation du filtrat brut, la répartition de la matière organique entre le filtrat clair et le solide centrifugé (pied) a été évaluée (Figure III.20). Le solvant hydro-alcoolique, alcalin ou non, est responsable d'un entraînement d'une quantité importante de matière organique dans le filtrat brut sous forme de fines particules solides insolubles (Figure III.20b). Sans réactif alcalin, le rendement d'extraction en matière organique (Figure III.20a) est supérieur pour le solvant le plus polaire.

La quantité de matière organique extraite est doublée en présence de soude, quel que soit le solvant. Par contre, extraire avec 20 % ou 50 % NaOH/MO_i n'a qu'une très faible influence sur la solubilisation de la matière organique. Ceci peut être lié aux temps de séjour très courts en extrudeur bi-vis qui lissent l'effet du réactif.

Enfin, les rendements en extractibles à 50 °C (80 mg MO/g MO_i) et à 100 °C (82 mg MO/g MO_i) sont comparables. Aucun effet de température n'est alors observé sur les rendements en extractibles ce qui laisse supposer l'absence de limitation cinétique pour l'extraction de la poudre organique en extrudeur bi-vis.

Le rendement maximal obtenu par extraction aqueuse en bi-vis, sans réactif alcalin, est comparable à celui obtenu pour 24 h de macération avec un ratio L/S de 16 à 20 °C (Figure II.20). Il représente 50 % du rendement au Fibertec (100 °C, 1 h, L/S = 100).

Le rendement maximal en bi-vis, en présence de soude (160 mg MO/g MO_i) représente respectivement 16 % et 53 % du rendement mesuré en hydrolyse alcaline en batch (20 °C, 24 h, L/S = 30, 480 % NaOH/MO_i) et par l'étape d'extraction alcaline de l'hydrolyse séquentielle (30 °C, 18 h, L/S = 25, 100 % NaOH/MO_i). Les résultats obtenus en bi-vis par extraction «douce» continue sous contrainte mécanique sont alors encourageants comparativement à ceux issus des extractions en conditions opératoires extrêmes citées précédemment.

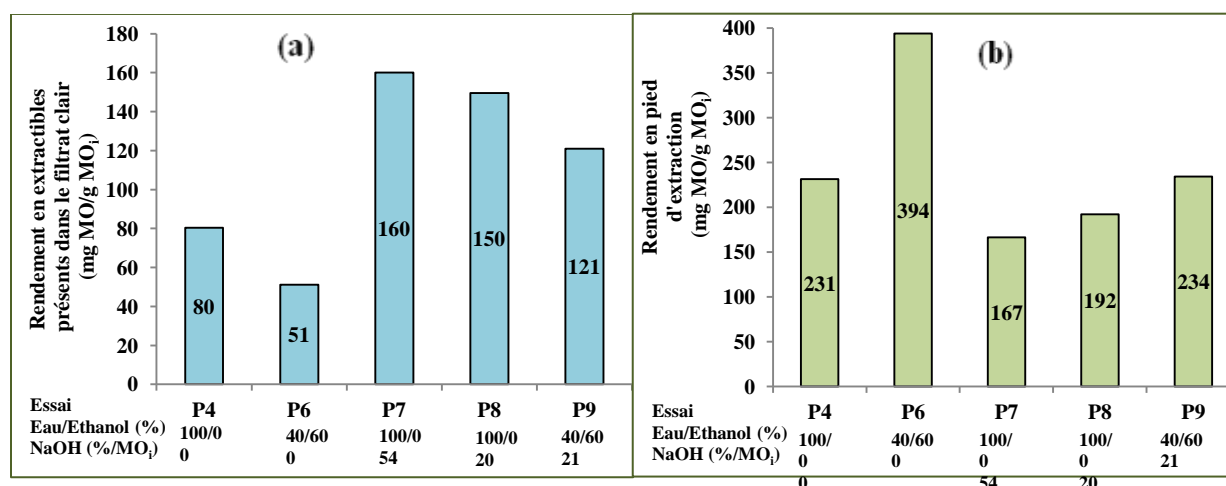


Figure III.20 : Rendements en extractibles dans le filtrat clair (a) et en pied d'extraction (b) à 50°C par extraction en extrudeur bi-vis. Cas de la poudre organique

Les rendements en composés phénoliques totaux dans les filtrats clairs sont représentés dans la Figure III.21.

Dans le cas de la poudre organique, l'effet de la température ainsi que celui du solvant d'extraction n'ont pas d'impact sur l'extraction des composés phénoliques totaux. Cela nous confirme l'absence de limitation cinétique et une sélectivité identique des deux solvants pour les polyphénols. Le rendement de 4 mg d'EAG/g MO_i obtenu dans ces conditions représente 50 % du potentiel en PP obtenu au Fibertec pour ces deux solvants. Les teneurs en polyphénols des extraits pour le solvant aqueux (4,6 %/MO_E) et hydro-alcoolique (7,1 %/MO_E) en bi-vis sont voisines de leurs correspondants en Fibertec.

Pour 20 % NaOH/ MO_i , l'absence de sélectivité du solvant pour les polyphénols de la poudre organique est confirmée. Par contre, l'addition de soude permet de tripler les rendements d'extraction en polyphénols par son action d'hydrolyse chimique et de gonflement de la matière qui facilite la diffusion du solvant. Par augmentation de la concentration en soude de 20 % à 54 % NaOH/ MO_i , cette double action est légèrement accrue.

La valeur maximale en polyphénols extraits (9 mg d'EAG/g MO_i), obtenue par simple passage de la matière végétale dans l'extracteur bi-vis en conditions alcalines, représente 54 % de la quantité mesurée en hydrolyse alcaline en batch pendant 24 h (Figure II.22). Par contre, dans l'extract, la teneur en polyphénols maximale de 7,4 %/ MO_E est bien supérieure aux 1,7 %/ MO_E mesurés par hydrolyse alcaline qui représente une pureté exploitable à l'échelle industrielle.

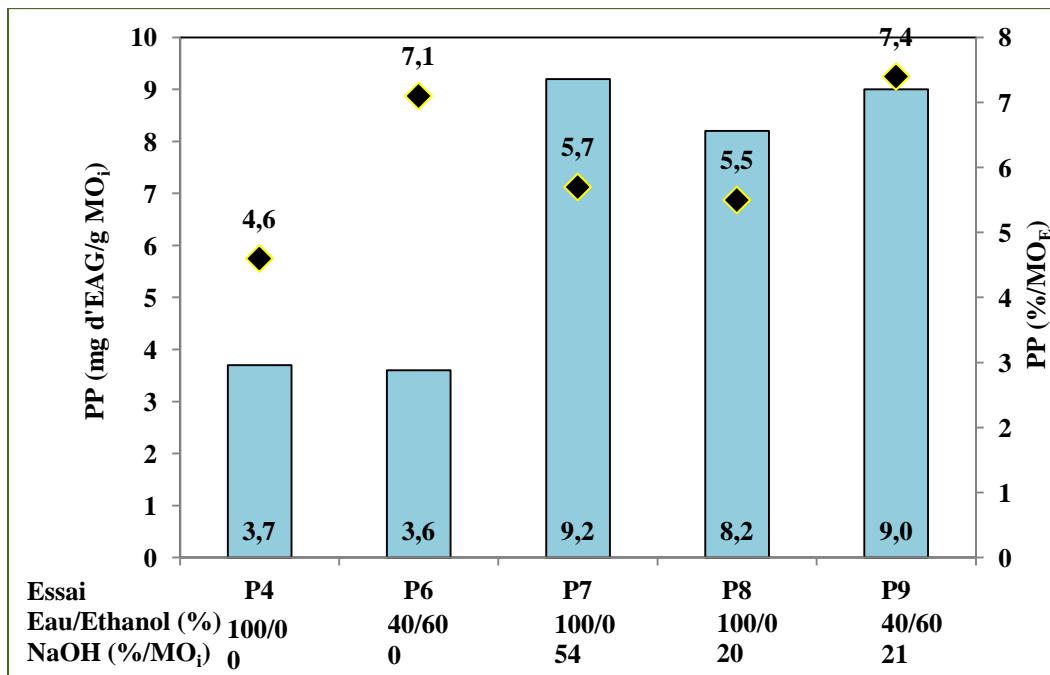


Figure III.21 : Rendements d'extraction en composés phénoliques totaux et teneur en composés phénoliques des fractions extraites (♦) dans les filtrats clairs à 50 °C par extraction en extrudeur bi-vis. Cas de la poudre organique

Les rendements en composés phénoliques analysés dans les filtrats des différents essais sont rassemblés dans la Figure III.22.

Contrairement à la tendance pour les polyphénols totaux, une efficacité supérieure du solvant hydro-alcoolique sur la solubilisation des acides phénoliques peut être notée.

Sans réactif alcalin, les rendements d'extraction en acides phénoliques et vanilline sont négligeables quels que soient la température ou le solvant. Même sous contrainte mécanique, ils sont donc bien inférieurs au potentiel de référence obtenu en Fibertec ($L/S = 100$, reflux, 1 h).

En présence de réactif alcalin, les teneurs en AF sont équivalentes (1 %/PP) quels que soient la concentration en NaOH ou le solvant d'extraction. Pour la Van et l'ApC le solvant hydro-alcoolique semble être le solvant le plus efficace.

Comme dans le cas des extractibles ou des polyphénols totaux, les rendements en acides phénoliques sont équivalents quelle que soit la concentration en soude (20 % ou 54 % NaOH/ MO_i).

La combinaison solvant hydro-alcoolique/NaOH est, comme dans le cas de la chènevotte, d'une grande efficacité. L'effet mécanique aide à la pénétration de la soude dans la matière végétale. L'hydrolyse d'une partie des liaisons chimiques liant les acides phénoliques à la paroi cellulosique est catalysée par la base. Le solvant hydro-alcoolique, diffusé efficacement dans la matrice végétale, extrait alors les molécules libérées.

L'essai alcalin hydro-alcoolique permettant d'extraire le maximum de composés phénoliques, conduit à des rendements en AF et Van inférieurs d'un facteur 2 à ceux obtenus par hydrolyse alcaline en batch alors que, dans le cas de l'ApC, ces rendements sont comparables (1,0-1,2 mg/g MO_i). Les conditions opératoires appliquées en extracteur bi-vis menant à ces résultats sont plus adaptées pour une application industrielle rapide, continue et économique : quantités de soude 20 fois inférieures, durées et ratio L/S plus faibles. Ce ratio L/S de 15 est même bien inférieur à la capacité d'absorption commerciale du lot (40 kg/L) et pourrait être optimisé lors d'essais complémentaires.

Parmi les polyphénols analysés, l'ApC est le plus abondant, suivi par l'AF et ensuite par la Van (Figure III.22). En extrudeur bi-vis, 7 à 12 fois plus d'ApC que d'AF ont été extraits. Le ratio ApC/AF est supérieur à celui obtenu par hydrolyse alcaline en batch (ratio $ApC/AF = 6$).

La caractérisation analytique des différents types de liaisons entre les acides phénoliques et la structure lignocellulosique avait démontré que l'acide férulique était lié essentiellement par des liaisons éthers, difficilement hydrolysables, et que l'acide coumarique était lié essentiellement par des liaisons esters, plus sensibles à des attaques chimiques. Dans le cas de l'extraction bi-vis, le fait de travailler sous contrainte mécanique à faible température a permis, avec un temps de séjour de la matière dans l'extrudeur de l'ordre de 1 à 3 minutes, un solvant aqueux et

20 % NaOH/MO_i, d'atteindre 51 % et 59 % des acides férulique et *p*-coumarique présents. Cette quantité de NaOH était suffisante pour hydrolyser la totalité des liaisons ester retenant l'acide férulique et la moitié des liaisons ester liant l'acide *p*-coumarique. En mettant en œuvre la combinaison soude/solvant hydro-alcoolique, les quantités d'acides *p*-coumarique et férulique extraites sont doublées, et montrent qu'il est possible, avec peu de NaOH, d'hydrolyser un grand nombre de liaisons chimiques si tant est que le réactif est diffusé de manière efficace dans la matière végétale. L'extraction hydro-alcoolique basique permet d'atteindre 59 % du potentiel en acide férulique et de dépasser de 13 % le potentiel en acide *p*-coumarique. Pour cette matière première, quel que soit le procédé d'extraction qui pourrait être choisi, nous préconiserions donc un solvant d'extraction hydro-alcoolique alcalin.

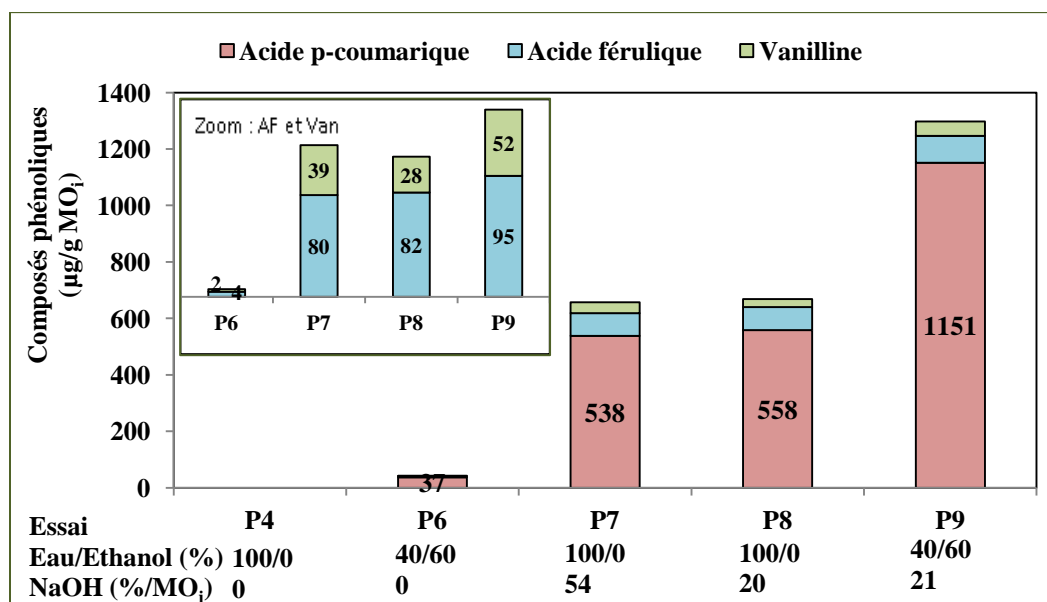


Figure III.22 : Rendements en composés phénoliques dans les filtrats clairs obtenus par extraction à 50 °C en extracteur bi-vis. Cas de la poudre organique

III.1.2.3. Caractérisation physico-chimique des extrudats

Comme dans le cas de la chènevotte, nous avons choisi d'analyser les extrudats des essais P8 et P9 (Tableau III.9).

Les résultats ADF-NDF obtenus pour les deux extrudats sont équivalents. L'absence de variation sur les taux d'hémicelluloses, de lignine et de cellulose dans les essais est synonyme d'une faible

déstructuration de la matière. Cela est confirmé par la répartition des fractions pariétales (Figure III.23). Concernant les extractibles NDF, ils sont légèrement supérieurs dans le cas de l'extrudat hydro-alcoolique ce qui confirme l'intérêt d'une extraction éthanolique alcaline.

Tableau III.9 : Taux de matière sèche, de matière minérales et caractérisation chimique par la méthode Van Soest and Wine des extrudats des essais P8 et P9

	Poudre organique	Essai P8	Essai P9
Matière sèche	89,9 ± 0,1 %	100 %	100 %
Matière minérale	13,2 ± 0,1 %	13,1 % (n = 2)	15,4 % (n = 2)
Résidu NDF	61,7 ± 0,04 %	64,4 ± 0,6 %	60,5 ± 0,4 %
Extractible NDF	38,3 %	35,6 ± 0,6 %	39,5 ± 0,4 %
Résidu ADF	51,0 ± 0,3 %	56,1 ± 0,2 %	47,6 ± 0,4 %
Extractible ADF	49,0 %	43,9 ± 0,2 %	52,4 ± 0,4 %
Taux de cellulose	44,0 ± 0,4 %	45,6 ± 0,3 %	41,0 ± 0,5 %
Taux de Lignine	7,0 ± 0,4 %	10,5 ± 0,1 %	6,7 ± 0,4 %
Taux d'hémicelluloses	10,7 ± 0,4 %	8,3 ± 0,5 %	12,8 ± 0,4 %

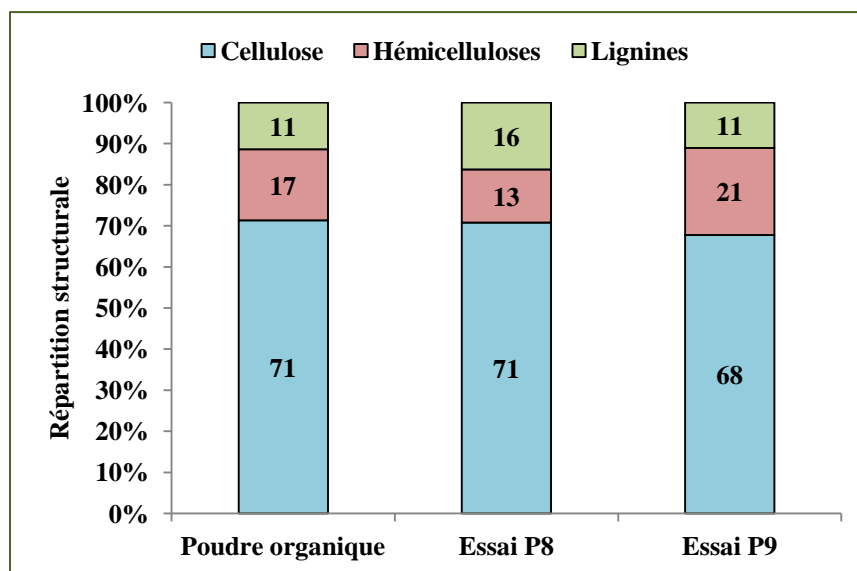


Figure III.23 : Répartition massique en lignines, cellulose et hémicelluloses dans la fraction pariétale des extrudats

L'extractibilité des extrudats par un solvant aqueux, hydro-alcoolique ou éthanolique a été ensuite étudiée au Fibertec (Figure III.24) : L/S=100, 1h, reflux. L'efficacité des trois solvants suit la même tendance de ce qui a été présenté tout au long de notre étude dans le cas de la poudre organique. Le solvant le plus polaire est le plus efficace pour extraire les molécules libres présentes dans les extrudats. Les rendements en extractibles sont supérieurs pour l'essai P9, ce

qui nous ramène aux conclusions sur l'efficacité avérée de la combinaison du solvant hydro-alcoolique et de la soude sous contrainte mécanique.

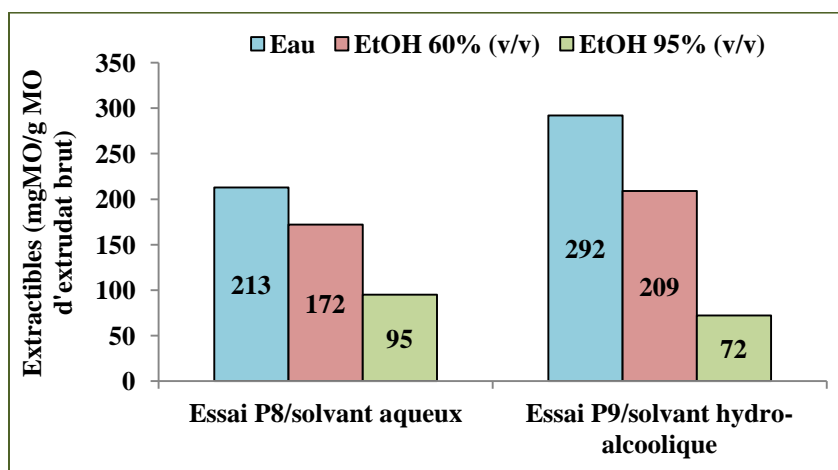


Figure III.24 : Rendements en extractibles des extrudats exprimés en mg MO/g MO d'extrudat brut. Cas de la poudre organique

Une extraction aqueuse des extrudats permet de doubler les quantités de matière organique extraite lors de l'extrusion. Ainsi, en cumulant les 2 fractions liquides, 30 % de la matière organique se retrouve solubilisée (Figure III.25). Cette valeur est comprise entre le potentiel au Fibertec (163 mg MO/g MO_i) et celui de l'hydrolyse alcaline en batch (973 mg/g MO_i). Ces résultats sont encourageants et montrent l'efficacité d'une deuxième étape complémentaire de lavage de l'extrudat.

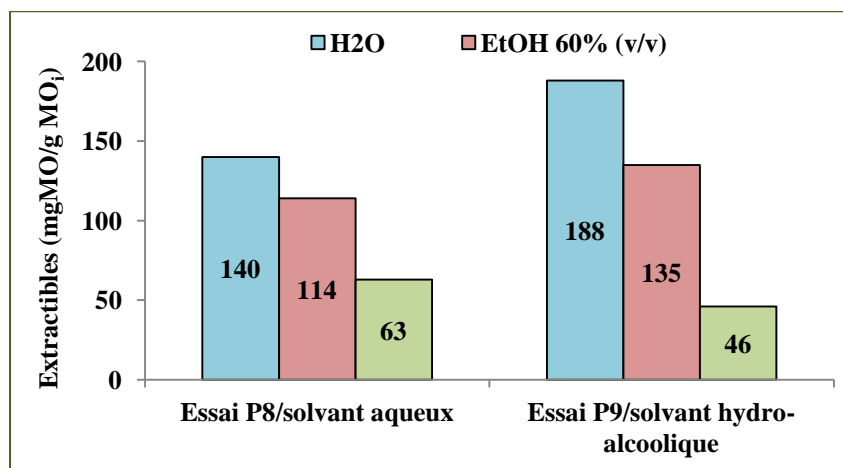


Figure III.25 : Rendements en extractibles des extrudats exprimés en mg MO/g MO_i. Cas de la poudre organique

Concernant les polyphénols totaux, l'efficacité du solvant aqueux est comparable à celle du solvant hydro-alcoolique (Figure III.26). La valeur maximale qui est de 5,4 mg MO/g MO_i est inférieure au rendement en polyphénols dans le filtrat clair (8,2 mg MO/g MO_i pour P8 et 9,0 mg MO/g MO_i pour P9), ainsi qu'au rendement maximal obtenu par extraction de la poudre organique au Fibertec avec le solvant aqueux (8,3 mg MO/g MO_i). En considérant le cas de l'extrudat P9, et en additionnant les rendements en polyphénols dans le filtrat clair et l'extrudat, une valeur proche (14,4 mg MO/g MO_i) du potentiel en PP de l'hydrolyse alcaline en batch (16,8 mg MO/g MO_i) est obtenue.

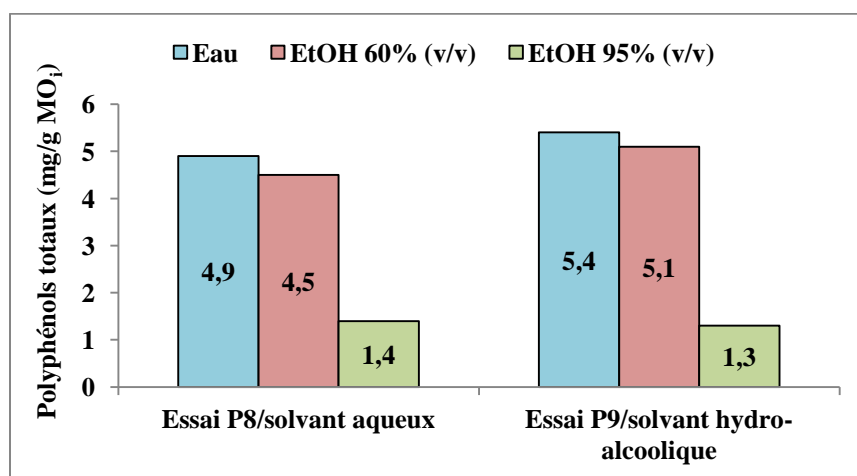


Figure III.26 : Rendements en polyphénols extraits des extrudats, exprimés en mgMO/g MO_i. Cas de la poudre organique

Extraire le solide déstructuré par un solvant polaire aqueux ou hydro-alcoolique permet de doubler les rendements d'extraction en ApC, qui est le composé phénolique le plus abondant dans les échantillons analysés (Tableau III.10). On constate que les rendements en composés phénoliques sont supérieurs à ceux obtenus par hydrolyse alcaline en batch. L'hydrolyse des liaisons ester entre les acides coumariques et la structure lignocellulosique est favorisée par l'extrusion bi-vis. Les molécules libérées par l'extraction sous contrainte thermo-mécanico-chimique, sont aisément extractibles lors d'un deuxième étage d'extraction. L'extrudeur bi-vis joue alors le rôle d'extracteur mais aussi de procédé de prétraitement de la matière végétale pour un deuxième étage d'extraction. Par contre, les liaisons éther liant les acides féruliques à la structure fibreuse ne sont que faiblement touchées par le traitement en extrudeur. L'hydrolyse des liaisons éthers nécessiterait des conditions expérimentales plus dures.

Tableau III. 10 : Rendements en composés phénoliques dans les filtrats clairs et extraits des extrudats. Cas de la poudre organique

	Acide férulique				Acide <i>p</i> -coumarique				Vanilline			
	Filtrat clair	Extrudat			Filtrat clair	Extrudat			Filtrat clair	Extrudat		
		Eau	Ethanol 60 %	Ethanol 95 %		Eau	Ethanol 60 %	Ethanol 95 %		Eau	Ethanol 60 %	Ethanol 95 %
P8	82	17	14	5	558	897	807	404	28	97	87	63
P9	95	17	15	2	1151	1014	872	333	52	142	133	99

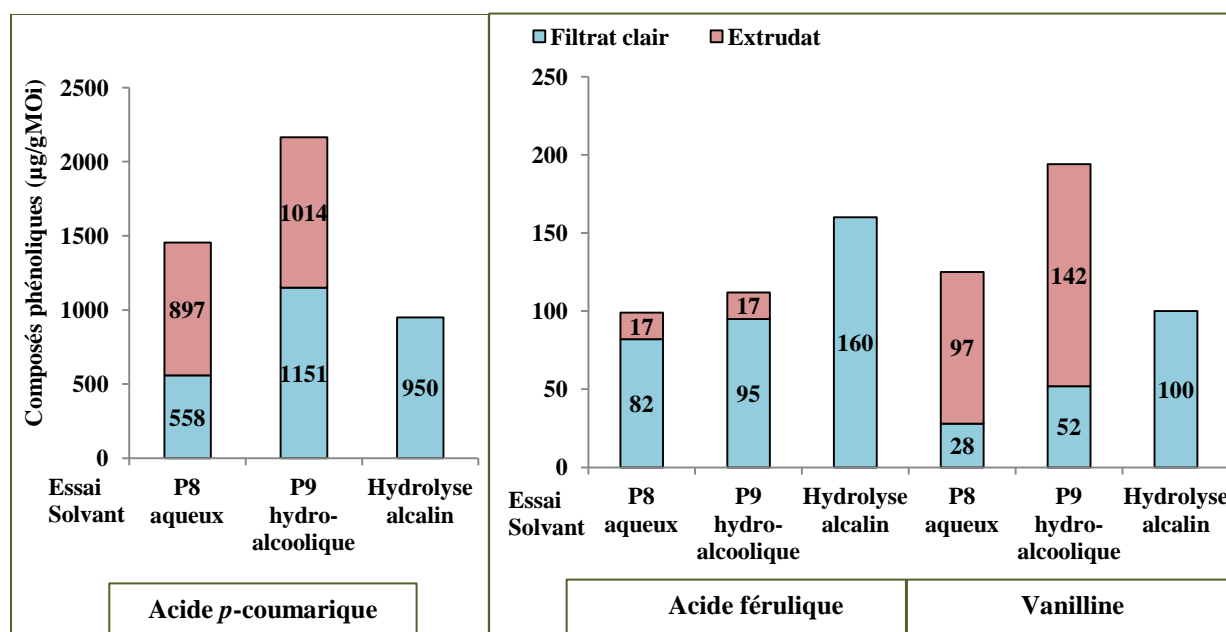


Figure III.27 : Rendements en composés phénoliques dans les différentes sorties de l'extraction en extrudeur bi-vis. Comparaison avec l'hydrolyse alcaline en batch. Cas de la poudre organique

Le broyage de la matière en tant qu'étape de prétraitement pourrait aussi être utile pour diminuer les limitations diffusionnelles.

Nous pouvons alors conclure qu'un procédé comprenant ces deux étapes : extraction bi-vis dans les conditions de l'essai P9 suivi d'un lavage à l'eau à reflux, pourrait conduire à des rendements encourageants en composés phénoliques et cela dans des conditions douces.

III. 2. Fractionnement par extraction assistée par micro-ondes

Dans cette partie, l'extractabilité des composés phénoliques à partir de chacun des deux coproduits a été étudiée par MAE. Par comparaison à toutes les méthodes d'extraction précédentes, l'influence du rayonnement micro-ondes sur l'extraction des composés phénoliques a été évaluée.

Le principe du chauffage par énergie micro-ondes est basé sur l'effet direct des rayonnements micro-ondes sur les molécules par conduction ionique et rotation dipolaire. Les molécules polaires (tels que les polyphénols) et les solutions ioniques absorbent plus fortement l'énergie micro-ondes en raison de leur moment dipolaire permanent. Il en résulte une augmentation rapide de la température (Veggi, Martinez, and Meireles 2012).

Afin de faciliter la distribution de la chaleur dans la matrice végétale, il est préférable de choisir un solvant ayant une constante diélectrique élevée ainsi qu'un facteur de dissipation élevé.

L'extraction classique est un processus qui demande beaucoup de temps de chauffe pour augmenter le taux de transfert de la matière dans le système d'extraction. En revanche, l'extraction assistée par micro-ondes est un processus d'extraction rapide ; l'interaction des molécules avec le champ électromagnétique génère un transfert rapide d'énergie pour le solvant d'extraction et les matières premières végétales. Ainsi, les teneurs en composés phénoliques des extraits obtenues par MAE qui sont, dans la plupart des cas, plus ou moins similaires à l'extraction sous reflux, montrent qu'évidemment, la MAE réduit le temps d'extraction (Proestos et Komaitis 2008).

III.2.1. Influence du solvant et de la température sur l'extraction des composés phénoliques : cas de la chènevotte

Les réacteurs micro-ondes à notre disposition sont décrits dans la partie Matériel et Méthodes. Les conditions opératoires ont été choisies afin d'être cohérentes avec les conditions MAE traditionnellement utilisées dans la littérature (Beejmohun et al. 2007; Dahmoune et al. 2014; Milutinović et al. 2014) mais aussi les plus proches possibles des paramètres fixés lors de l'extrusion bi-vis. En plus de l'effet des rayonnements micro-ondes sur l'extraction des composés phénoliques à partir de la chènevotte, les effets thermique et chimique ont été étudiés :

- La température : 50 ou 100°C pour une extraction aqueuse
- Le solvant d'extraction pour une température fixée à 50°C :
 - o Eau
 - o Ethanol 60 %
 - o Extraction aqueuse alcaline : 10 ou 25 % NaOH/MO_i
 - o Extraction hydro-alcoolique alcaline : 10 % NaOH/MO_i dans l'éthanol 60 %.

La durée de l'extraction choisie est de 7 minutes : une rampe de 4 minutes suivie d'un plateau de 3 minutes. Même si elle représente trois fois celle de l'extrusion bi-vis (temps de séjour : 1-3 minutes environ), choisir une durée d'extraction inférieure ne pouvait pas être techniquement réalisable en MAE. Le ratio liquide/solide (L/S) fixé à 6 lors de l'extraction bi-vis, n'est techniquement pas accessible pour des extractions batch puisqu'il est inférieur au taux de gonflement de cette dernière. Le ratio L/S minimal pour accéder à une séparation liquide/solide post-extraction acceptable est de 12.

Pour cette étude d'extraction MAE, la chènevotte a été préalablement broyée à 0,5 mm.

Tableau III.11 : Conditions opératoires des essais d'extraction de la chènevotte en MAE

Essai	T (°C)	Eau/Ethanol	% NaOH/MO _i
CHMO1	50	100/0	0
CHMO2	100	100/0	0
CHMO3	50	40/60	0
CHMO4	50	100/0	25
CHMO5	50	100/0	10
CHMO6	50	40/60	10

L/S = 12, durée : 7 min, puissance : 1200 watts

Le pourcentage de matière organique pouvant être extrait de la chènevotte par extraction MAE est présenté dans la Figure III.28.

En absence de réactif alcalin, l'effet de la température ainsi que celui du solvant d'extraction sur le rendement est négligeable. L'extraction MAE semble être soumise à une limitation diffusionnelle. Les rendements en extractibles sont comparables et équivalents à ceux obtenus par macération ou en extraction bi-vis. Pour une durée d'extraction similaire, la littérature montre que la MAE est plus efficace que la macération. Les travaux de Jacotet (Jacotet-Navarro et al. 2015) sur l'extraction des acides rosmarinique, carnosique et ursolique du romarin en sont

un exemple. Les rendements en extractibles obtenus par extractions MAE et conventionnelle à l'éthanol 90%, à reflux, (30 min, L/S = 20) sont comparables.

Le rendement en extractibles varie positivement avec l'augmentation de la concentration en soude. Ainsi, pour une concentration en NaOH de 10 %/MO_i, ce rendement est triplé (56 mg MO/MO_i) et il est quadruplé (78 mg MO/MO_i) pour une concentration de 25 %/MO_i. L'augmentation de la concentration en soude permet une hydrolyse plus importante de la matière et donc la solubilisation de quantités supérieures de molécules dans le solvant d'extraction.

Le rendement maximal extrait lors de l'essai CHMO4 (78 mg/gMO_i) est voisin du potentiel en extractibles (82 mg MO/MO_i) obtenu en Fibertec pour un solvant aqueux (Tableau II.9) et en extraction bi-vis pour des conditions opératoires « équivalentes » (Figure III.12). Ce rendement représente 9 % du potentiel obtenu par hydrolyse alcaline dure en batch.

La substitution de l'eau par l'éthanol 60 % en conditions alcalines (CHMO6) aboutit à la diminution du rendement en extractibles puisque l'essentiel des molécules polaires présentes dans la matière végétale voit sa solubilité varier avec la polarité du solvant d'extraction.

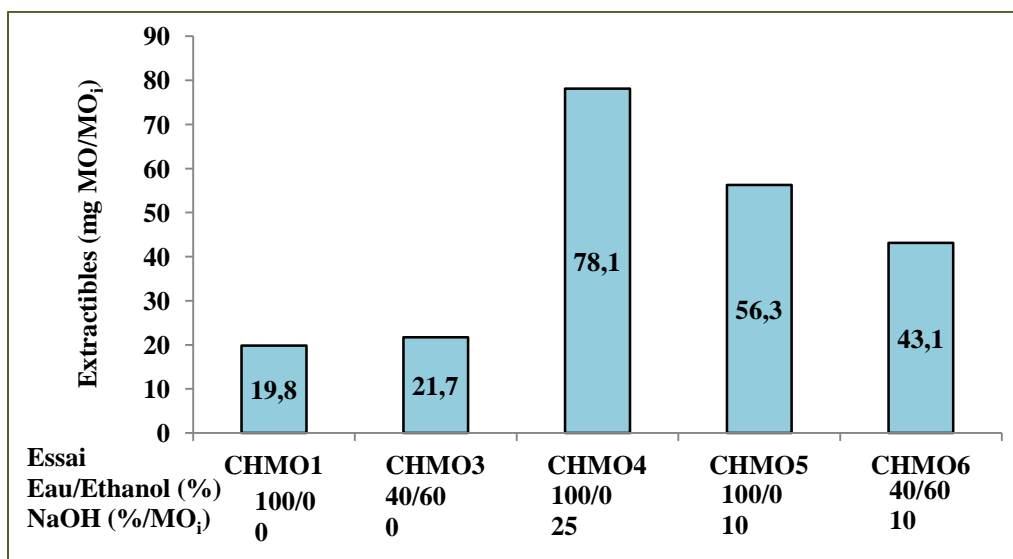


Figure III.28 : Rendements en extractibles par extraction MAE à 50 °C. Cas de la chènevotte

Tableau III.12 : Rendements d'extraction MAE. Comparaison avec l'extraction en extrusion bi-vis et l'hydrolyse alcaline en batch. Cas de la chènevotte

		T (°C)	% eau/ Ethanol	%NaOH/ MO _i	Rendement (mg MO/gMO _i)	PP (mg/ gMO _i)	PP/MO _E (%)	AF (µg/ gMO _i)	AF/PP (%)	Ap C (µg/ gMO _i)	Ap C/PP (%)	Van (µg/ gMO _i)	Van/PP (%)
Extraction en MAE	CHMO1	50	100/0	0	19,8	0,9	4,5	12	1,3	54	6,0	0	0
	CHMO2	100	100/0	0	21,1	1,0	4,7	0	0	0	0	0	0
	CHMO3	50	40/60	0	21,7	2,4	11,1	0	0	44	1,8	0	0
	CHMO4	50	100/0	25	78,1	5,7	7,3	124	2,2	2349	41,2	143	2,5
	CHMO5	50	100/0	10	56,3	3,7	6,6	58	1,6	762	20,6	74	2,0
	CHMO6	50	40/60	10	43,1	4,9	11,4	52	1,1	2977	60,8	126	2,6
Extraction en bi-vis	CH4	50	100/0	0	23,5	0,6	2,5	8	1,3	45	7,5	10	0,7
	CH5	100	100/0	0	22,9	0,7	3,2	7	0,9	62	8,3	7	1,0
	CH6	50	40/60	0	22,9	2,3	10,2	7	0,3	59	2,6	11	0,5
	CH7	50	100/0	31,8	82,3	2,2	2,7	35	1,6	440	19,9	17	0,7
	CH8	50	100/0	12,7	70,4	4,0	5,6	67	1,7	1127	28,5	25	0,7
	CH9	50	40/60	12,7	64,9	5,8	9,0	99	1,7	1814	31,2	53	0,9
Hydrolyse alcaline		20	100/0	480	836	12,6	-	300	-	3540	-	180	-
AP libres		Reflux	-	-	-	1,7	-	26	-	507	-	-	-
AP/liaison ester		30	100/0	100	-	3,8	-	6	-	1613	-	-	-
AP/liaison éther		87	100/0	-	-	10,4	-	268	-	1420	-	-	-

Les résultats pour les composés phénoliques sont présentés dans la Figure III.29 et sont exprimés en mg d'EAG/gMO_i. Aucun effet de température n'a été détecté. Comme nous l'avons dit précédemment, l'extraction de la chènevotte est soumise à une limitation diffusionnelle plus que cinétique quelle que soit la technologie d'extraction. Selon (Tsubaki, Ozaki, et Azuma 2010), la décomposition de la structure lignocellulosique est observée à partir de 170 °C sous micro-ondes. L'étude a été effectuée sur les noyaux de *Prunus mume*. Une température élevée serait donc préférable, ce qui a été confirmé par l'étude de Shuntaro sur l'extraction des composés phénoliques de différents types de résidus de thé, dans un solvant aqueux à 230°C (Tsubaki, Sakamoto, and Azuma 2010).

A 50 °C, une augmentation de la teneur de composés phénoliques extraits par l'éthanol 60 % est observée, ce qui est cohérent avec l'ensemble des résultats acquis avec les autres technologies d'extraction. Le rendement en polyphénols obtenu avec le solvant hydro-alcoolique représente 33 % du potentiel Fibertec. Comparable au rendement obtenu en macération avec le même solvant d'extraction (Cf.Chapitre II, partie II.2.1.1), la MAE présente l'avantage de minimiser la durée d'extraction.

L'introduction d'une quantité de soude, même faible, permet le gonflement de la matière première et assure une amélioration de la diffusion du solvant réactif, augmentant du même coup, les rendements d'extraction en composés phénoliques. La combinaison entre l'éthanol

60 % et une base conduit à une maximisation de la quantité de polyphénols extraits par les effets cumulés de réactivité chimique et de solubilisation.

La teneur en polyphénols de l'extrait (11,4 %/MO_E) est démonstrative d'une sélectivité accrue des composés phénoliques pour le solvant hydro-alcoolique.

La valeur de rendement maximale obtenue avec une concentration de 25 % NaOH/MO représente 45 % du potentiel d'extraction par hydrolyse alcaline en batch (Figure II.20). En extrayant sous assistance des micro-ondes en conditions alcalines, il semble que de rendements intéressants en composés phénoliques soient atteints dans des conditions bien plus douces que celles de l'hydrolyse alcaline en batch.

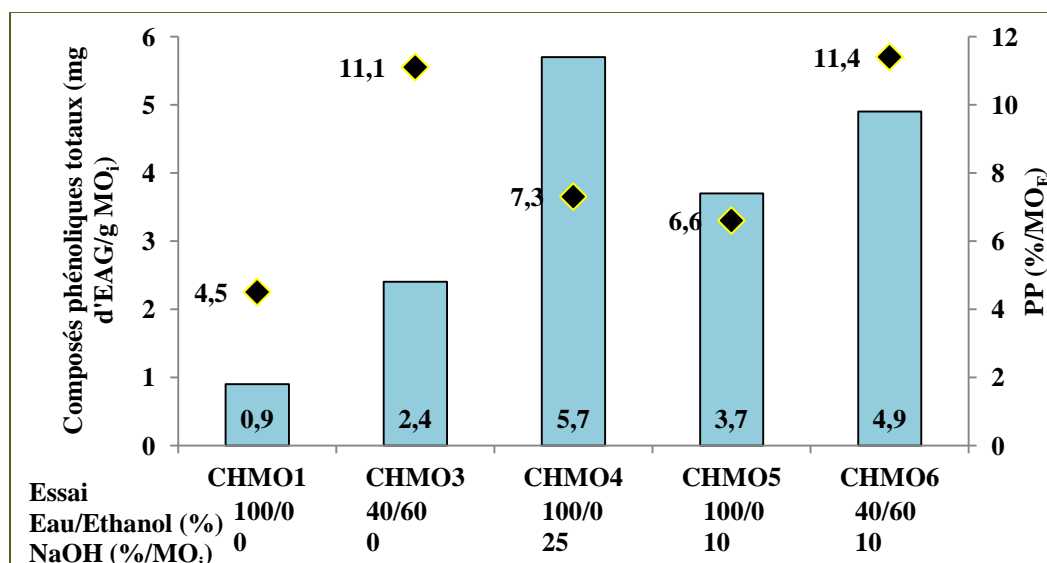


Figure III.29 : Rendements d'extraction et teneur (♦) en composés phénoliques totaux des filtrats - Extraction MAE à 50 °C. Cas de la chènevotte

L'acide *p*-coumarique est une fois encore le composé phénolique le plus abondant (Figure III.30). En absence de réactif alcalin, aucun effet de la température ni du solvant d'extraction n'est observé. Les rendements sont inférieurs à ceux obtenus en extraction batch par macération (L/S = 16, 20 °C, 24 h) et en Fibertec (L/S = 100, reflux, 1 h). Même en présence du rayonnement micro-ondes, l'extraction des acides phénoliques s'avère être très limitée en absence de réactif.

Les rendements en composés phénoliques obtenus en MAE alcaline, suivent la même tendance que les rendements en polyphénols totaux. Ainsi, à 25 % NaOH/MO_i, 2 à 3 fois plus d'acides

phénoliques sont extraits qu'à 10 % NaOH/MO_i. L'influence positive de la soude sur la rupture des liaisons chimiques est confirmée. Le rendement optimal en acide coumarique (3 mg/g MO_i) est obtenu pour le solvant hydro-alcoolique alcalin. Pour un rendement maximal en acide férulique, une augmentation de teneur en soude dans le solvant extractant doit être privilégiée afin de forcer l'hydrolyse d'un maximum de liaisons éther.

Les rendements en ApC et en Van sont voisins de ceux obtenus par hydrolyse alcaline en batch. Le rendement en AF est inférieur d'un facteur de 6. L'acide *p*-coumarique est extrait avec un ratio ApC/AF compris entre 13 et 60 en conditions alcalines. Ce dernier est de 12 pour l'hydrolyse alcaline en batch. La sélectivité de la MAE est alors plus orientée vers l'extraction de l'ApC et donc vers la rupture majoritaire des liaisons ester.

Ces résultats mettent en évidence l'intérêt des rayonnements micro-ondes pour accélérer l'action chimique des réactifs et la solubilisation des molécules extraites. En tant qu'avantages supplémentaires de la MAE, le ratio L/S, la concentration en soude et la durée d'extraction sont inférieurs.

En s'intéressant plus particulièrement à la structure lignocellulosique de la chènevotte et aux différentes liaisons entre les acides férulique et *p*-coumarique et les constituants pariétaux, il peut être conclu qu'une faible concentration de NaOH (10 %/MO_i) est suffisante pour hydrolyser un grand nombre de liaisons avec la seule condition de la combiner avec un solvant ayant la meilleure affinité pour les composés phénoliques. Dans le cas de l'essai optimal par extraction hydro-alcoolique alcaline, la totalité des AF et ApC liés par des liaisons esters est extraite ainsi que respectivement 7 et 60 % des molécules liées par des liaisons éthers. L'utilisation de l'extraction MAE présente alors un grand intérêt pour la production d'extraits enrichis en acides phénoliques et plus particulièrement en ApC.

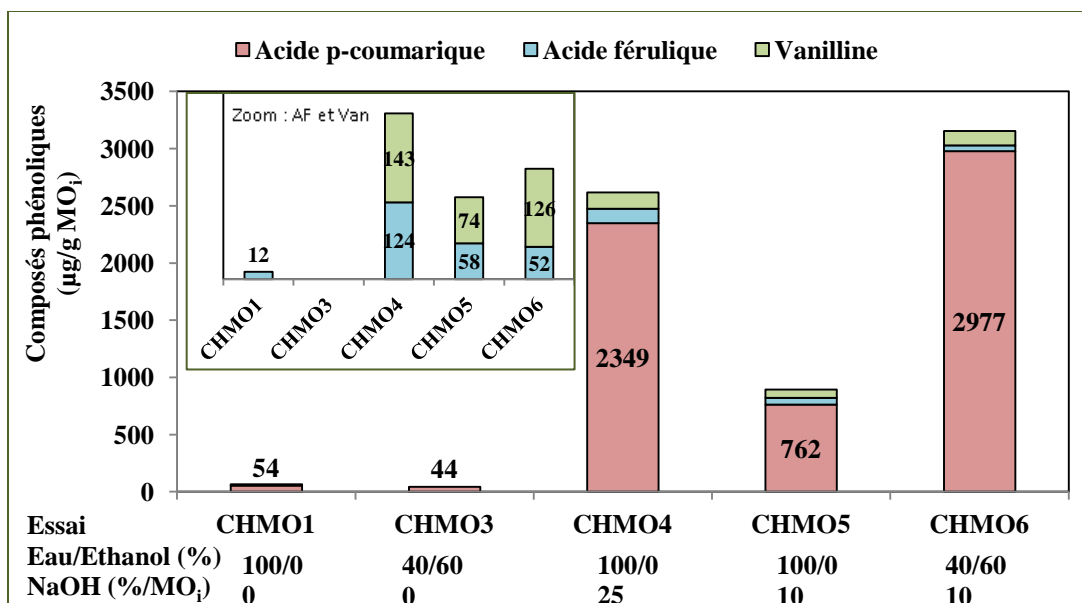


Figure III.30 : Rendements d'extraction en composés phénoliques par MAE à 50 °C. Cas de la chènevotte

III.2.2. Influence du solvant et de la température sur l'extraction des composés phénoliques : cas de la poudre organique

Les conditions opératoires sont identiques à celles appliquées pour la chènevotte (Tableau III.13)

Tableau III.13 : Conditions opératoires des essais d'extraction de la poudre organique en MAE

Essai	T (°C)	eau/Ethanol	% NaOH/MO _i
PMO1	50	100/0	0
PMO2	100	100/0	0
PMO3	50	40/60	0
PMO4	50	100/0	28,8
PMO5	50	100/0	11,5
PMO6	50	40/60	11,5

L/S = 12, durée : 7 min, puissance : 1200 watts

Le pourcentage de matière organique extrait par MAE à 50 °C est présenté dans la Figure III.31.

Les conclusions rejoignent toutes celles précédemment exposées :

- Le solvant le plus polaire, avec ou sans réactif alcalin, extrait la quantité maximale de matière organique. Ce rendement (50 °C, L/S = 12, 7 min) est inférieur à celui de la

macération (20 °C, L/S = 16, 24 h) (Tableau II.26) et représente le tiers des potentiels obtenus par extraction Fibertec (à 100 °C, L/S = 100, 1 h).

- Le rendement augmente avec l'augmentation de la concentration en soude. Passer de 12 % NaOH/MO_i à 29% de NaOH/MO_i permet de doubler le rendement pour atteindre 193 mg MO/MO_i.
- Le rendement maximal pour l'essai PMO4 (L/S = 12, 50 °C, 7 min, 29 % NaOH/MO_i) représente 20 % du potentiel obtenu en hydrolyse alcaline en batch (L/S = 30, 20 °C, 24 h, 480 % NaOH/MO_i) et 64 % du rendement obtenu à l'étape alcaline de l'hydrolyse séquencée (L/S = 25, 30 °C, 18 h, 100 % NaOH/MO_i).
- Comme pour les autres essais, les résultats ne montrent aucun effet de la température sur le rendement d'extraction.

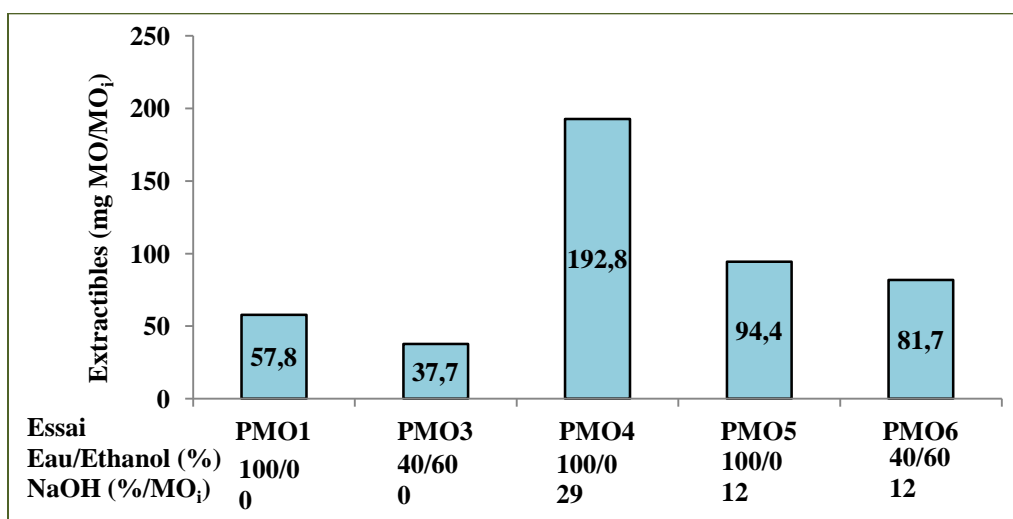


Figure III.31 : Rendement en extractibles - Extraction MAE à 50 °C. Cas de la poudre organique

Tableau III.14 : Rendements d'extraction MAE. Comparaison avec l'extraction en extrusion bi-vis et l'hydrolyse alcaline en batch. Cas de la poudre organique

		T (°C)	% eau/ Ethanol	%NaOH/ MO _i	Rendement (mg MO/gMO _i)	PP (mg/ gMO _i)	PP/MO _E (%)	AF (µg/ gMO _i)	AF/PP (%)	Ap C (µg/ gMO _i)	Ap C/PP (%)	Van (µg/ gMO _i)	Van/PP (%)
Extraction en MAE	PMO1	50	100/0	0	57,8	2,9	5,0	17	0,6	0	0,0	0	0
	PMO2	100	100/0	0	56,5	2,7	4,8	0	0	0	0	0	0
	PMO3	50	40/60	0	37,7	3,8	10,1	0	0	18	0,5	0	0
	PMO4	50	100/0	28,8	192,8	7,3	3,8	79	1,1	896	12,3	107	1,5
	PMO5	50	100/0	11,5	94,4	5,7	6,0	75	1,3	982	17,2	96	1,7
	PMO6	50	40/60	11,5	81,7	5,8	7,1	95	1,6	973	16,8	69	1,2
Extraction en bi-vis	P4	50	100/0	0	80,4	3,7	4,6	0	0,0	0	0	0	0
	P5	100	100/0	0	82,3	3,6	4,3	0	0,0	0	0	0	0
	P6	50	40/60	0	51,2	3,6	7,1	3,5	0,1	37	1,0	2,4	0,1
	P7	50	100/0	53,7	160,1	9,2	5,7	80,0	0,9	538	5,9	39,0	0,4
	P8	50	100/0	20,0	149,5	8,2	5,5	82,0	1,0	558	6,8	28,0	0,3
	P9	50	40/60	21,1	120,9	9,0	7,4	94,7	1,1	1150	12,8	52,0	0,6
Hydrolyse alcaline		20	100/0	480	973	16,8	-	160	-	950	-	100	-
AP libres		Reflux	-	-	-	2,3	-	21	-	202	-	-	-
AP/liaison ester		30	100/0	100	-	5,0	-	38	-	700	-	-	-
AP/liaison éther		87	100/0	-	-	5,2	-	101	-	98	-	-	-

Les composés phénoliques totaux sont représentés dans la Figure III.32 et sont exprimés en mg d'EAG/gMO_i.

Le rendement pour le solvant hydro-alcoolique représente 51 % du potentiel en polyphénols obtenu en Fibertec. La teneur en polyphénols des extraits en extraction MAE hydro-alcoolique (10,1 %/MO_E) est supérieure aux 7,1 %/MO_E obtenus en bi-vis et aux 7,7 %/MO_E mesurés en Fibertec.

La teneur maximale en composés phénoliques totaux (7 mg d'EAG/g MO_i), obtenue pour l'extraction à 29 % NaOH/MO_i représente 44 % du potentiel mesuré en hydrolyse alcaline en batch (480 % NaOH/MO_i) pendant 24 h. Ce résultat est plus que satisfaisant puisqu'en extraction MAE le ratio L/S, la durée et la concentration en soude sont bien inférieurs.

Le solvant hydro-alcoolique alcalin ne présente aucun effet notable sur le rendement d'extraction des composés phénoliques. L'action du réactif alcalin prévaut donc sur la polarité du solvant dans le cas de l'extraction MAE des polyphénols de poudres organiques.

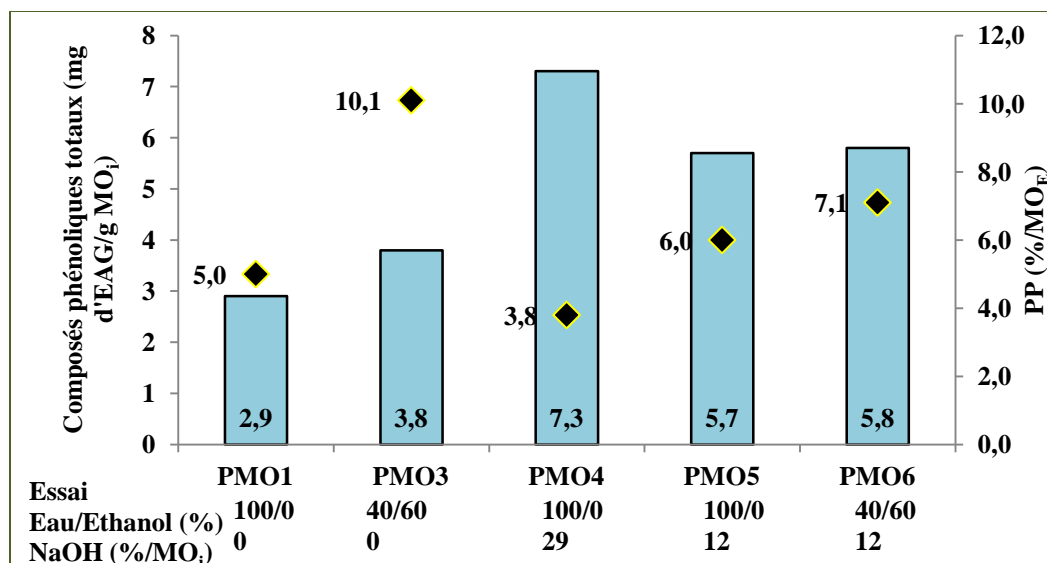


Figure III.32 : Rendements d'extraction et teneur (♦) en composés phénoliques totaux des filtrats - Extraction MAE à 50 °C. Cas de la poudre organique

Les rendements en acides coumarique et férulique sont très faibles pour des réactions sans réactif (Figure III.33). Par contre, en extrayant en milieu basique, les rendements sont voisins quels que soient la concentration en soude ou le solvant. Contrairement aux autres méthodes d'extractions de la poudre organique, en réacteur micro-ondes, l'éthanol 60 % n'est pas plus efficace que l'eau.

Les rendements en ApC sont équivalents voire supérieurs à celui de l'hydrolyse alcaline en batch tandis que le rendement maximal en AF représente 60 % du potentiel de l'hydrolyse alcaline. La vanilline est très présente dans les extraits et elle dépasse le potentiel dans le cas d'une concentration de soude de 29 %/MO_i.

L'ApC est majoritairement extrait avec un ratio ApC/AF compris entre 10 et 13. Ce dernier est égal à 6 dans le cas de l'hydrolyse alcaline.

Ainsi, la technique micro-onde est efficace pour l'extraction des composés phénoliques de la poudre organique et donne des résultats encourageants même sans l'application de conditions opératoires extrêmes. En considérant la répartition des acides en fonction du type de liaison dans la structure lignocellulosique, l'extraction micro-ondes permet d'atteindre les potentiels en ApC étherifiés et estérifiés et en AF estérifié tandis qu'elle conduit à une extraction de 36 % des AF étherifiés.

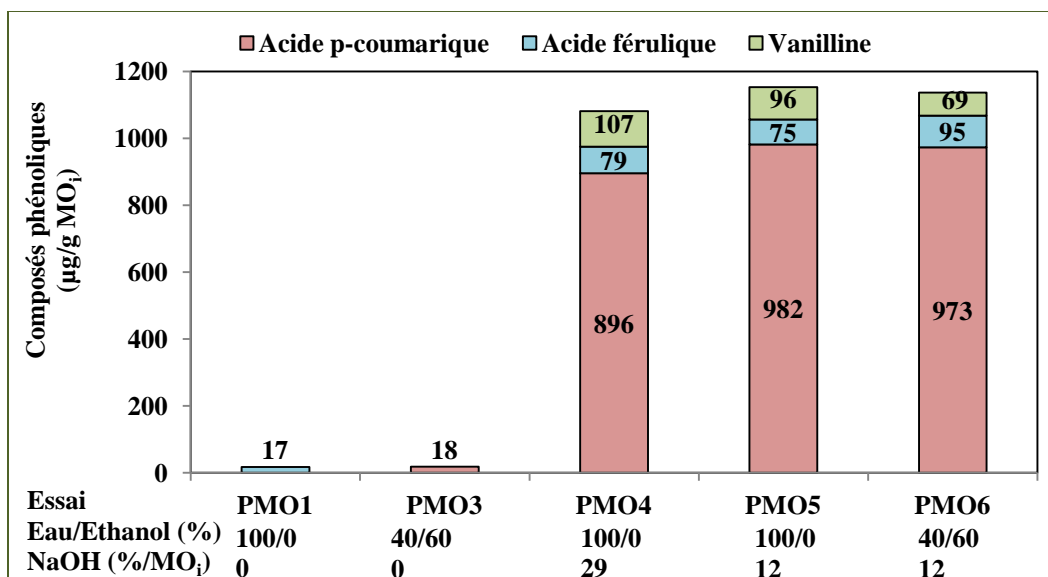


Figure III.33 : Rendements d'extraction en composés phénoliques par MAE à 50 °C. Cas de la poudre organique

III. 3. Comparaison des technologies d'extraction des composés phénoliques

III.3.1. La chènevotte

La Figure III.34 regroupe les rendements en composés phénoliques totaux des extractions MAE et par extrusion bi-vis, obtenus dans les différentes conditions opératoires étudiées.

En l'absence de réactif, les deux technologies sont équivalentes pour l'extraction des composés phénoliques. Même si l'extraction est plus efficace avec un solvant hydro alcoolique dans les 2 cas, elle n'en demeure pas moins très limitée sans l'addition d'un réactif d'hydrolyse. Ainsi, nous retiendrons pour la discussion uniquement les essais réalisés en conditions alcalines.

Pour une concentration en NaOH de 10 %/MO_i, les rendements d'extraction sont comparables pour les deux procédés, avec une amélioration en présence de solvant hydro-alcoolique. Ainsi, pour ces deux technologies qui abaissent les limitations diffusionnelles, l'action conjointe du réactif alcalin, même faiblement concentré et du solvant hydro-alcoolique suffit pour extraire des quantités satisfaisantes de polyphénols dans des conditions douces.

L'augmentation de la quantité de réactif alcalin à 25 %/MO_i a une influence différente sur chacun des procédés. En MAE, elle augmente directement les rendements d'extraction par son

effet hydrolytique et elle n'a aucun impact technologique puisque la séparation liquide/solide est réalisée comme un post-traitement en dehors des réacteurs micro-ondes. Par contre, en extraction bi-vis, le réactif alcalin est partie prenante dans le procédé puisqu'il a un impact direct sur l'étape de séparation liquide/solide. Une augmentation de la quantité de réactif alcalin, même si elle conduit à une hydrolyse supérieure de la matière végétale, est aussi responsable de l'abaissement de la tenue mécanique du solide dans l'extrudeur et donc de sa moindre résistance au niveau de la zone de séparation liquide/solide. Ce point pourrait être amélioré en durcissant le profil de vis par un choix de contrefilet plus contraignant (augmentation de longueur et/ou diminution du pas de vis).

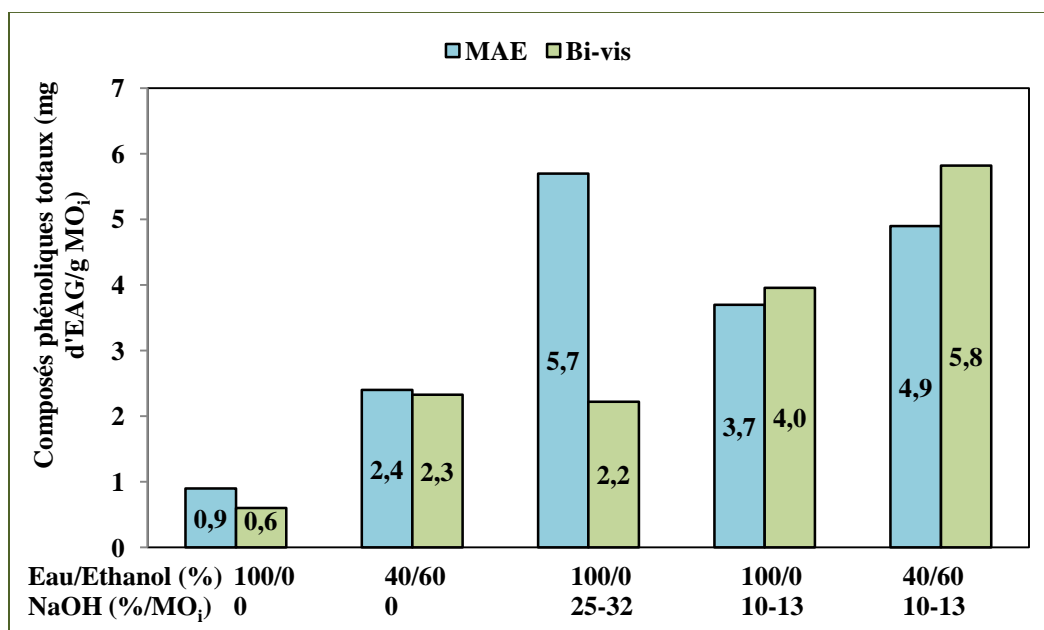


Figure III.34 : Rendements en polyphénols totaux par extraction en réacteur micro-ondes et en extracteur bi-vis à 50°C. Cas de la chènevotte

Le Tableau III.15 permet de comparer les rendements en composés phénoliques pour chacune des deux méthodes d'extraction. Dans l'ensemble des conditions opératoires étudiées, l'extraction MAE aqueuse avec NaOH 25%/MO_i est la plus efficace.

Pour des concentrations en soude inférieures et un solvant hydro-alcoolique, l'extraction de l'ApC est plus efficace par MAE tandis que l'extrusion bi-vis favorise l'extraction de l'AF. En broyant préalablement la chènevotte, les rendements par extraction bi-vis pourraient être améliorés.

Tableau III.15 : Tableau récapitulatif des rendements d'extraction en acides phénoliques de la chènevotte

		%EtOH (v/v)	%NaOH /MO _i	L/S	T (°C)	Durée	AF (µg/gMO _i)	AC (µg/gMO _i)	ApC/ AF
Extraction en bi-vis	CH7	0	32	6	50	1-3 min	35	440	13
	CH8	0	13	6	50	1-3 min	67	1127	17
	CH9	60	13	6	50	1-3 min	99	1814	18
Extraction en MAE	CHMO4	0	25	12	50	7 min	124	2349	20
	CHMO5	0	10	12	50	7 min	58	762	13
	CHMO6	60	10	12	50	7 min	52	2977	60
Hydrolyse	Libres	60	0	25	Reflux	6h	26	507	20
	Ester	0	100	25	30	24h	6	1613	269
	Ether	-	-	-	-	-	268	1420	5
	Total	0	480	30	20	24h	300	3540	12

III.3.2. La poudre organique

La Figure III.35 regroupe les rendements en composés phénoliques totaux des extractions MAE et extrusion en bi-vis de la poudre organique.

L'extrusion bi-vis est plus efficace que l'extraction MAE. Cela suggère qu'en bi-vis, il y a une amélioration des limitations diffusionnelles dû à l'effet mécanique qui rend l'échange liquide/solide plus efficace qu'en MAE. Comparativement à la chènevotte, la diffusion du solvant par effet mécano-chimique dans la poudre organique est facilitée par une granulométrie initialement plus faible. Pour les deux technologies, l'addition d'un réactif d'hydrolyse rend l'extraction deux fois plus efficace.

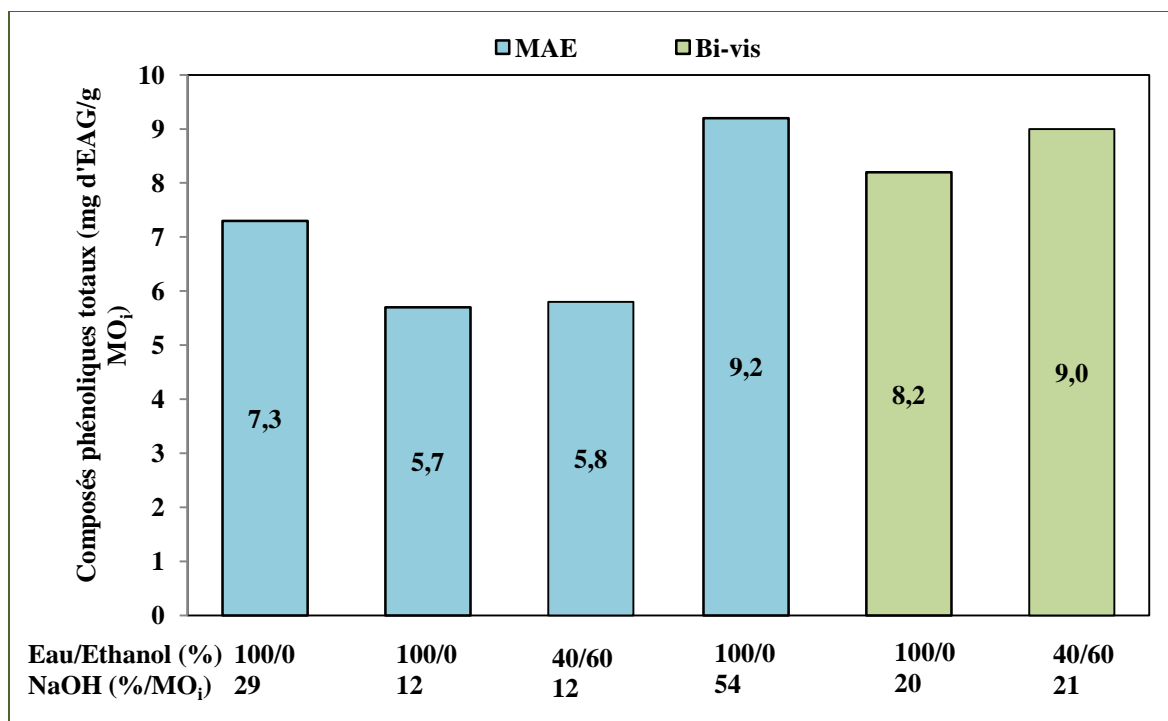


Figure III.35 : Rendements en polyphénols totaux par extraction en réacteur micro-ondes et en extracteur bi-vis à 50°C. Cas de la poudre organique.

Les rendements en composés phénoliques pour chacune des deux méthodes d'extraction sont représentés dans le Tableau III.16.

Pour chacune des deux méthodes d'extraction en milieu aqueux, l'augmentation de la concentration en soude n'aboutit pas à une amélioration des rendements en acides phénoliques. Par contre, pour des concentrations en soude inférieures (21 et 12 %NaOH/ MO_i en bi-vis et MAE respectivement), une extraction plus efficace des composés phénoliques est observée. Cette efficacité est remarquable dans le cas de l'extraction de l'ApC.

Tableau III.16 : Tableau récapitulatif des rendements d'extraction en acides phénoliques de la poudre organique

		%EtOH (v/v)	%NaOH /MO _i	L/S	T (°C)	Durée	AF (µg/gMO _i)	ApC (µg/gMO _i)	ApC/ AF
Extraction en bi-vis	P7	0	54	6	50	1-3 min	80	538	7
	P8	0	20	6	50	1-3 min	82	558	7
	P9	60	21	6	50	1-3 min	95	1150	12
Extraction en MAE	PMO4	0	29	12	50	7 min	79	896	11
	PMO5	0	12	12	50	7 min	75	982	13
	PMO6	60	12	12	50	7 min	95	973	10
Hydrolyse	Libres	60	0	25	Reflux	6h	21	202	10
	Ester	0	100	25	30	24h	38	700	18
	Ether	-	-	-	-	-	101	98	1
	Total	0	480	30	20	24h	160	1000	6

III.3.3. Vers un procédé industriel pour l'extraction des acides phénoliques

Le développement ou la mise en œuvre d'un procédé à grande échelle prend en compte plusieurs critères afin d'atteindre des rendements optimaux mais aussi de diminuer les impacts environnementaux. Parmi ces critères, il est possible de citer :

- L'énergie dépensée
- La durée
- Le ratio L/S
- La quantité de réactifs (qui influence le post traitement)
- Le nombre d'étapes (transfert de matière d'un réacteur à un autre, multi-procédés)

La minimisation de ces différents critères réduit les coûts de production et permet de juger de l'efficacité du procédé.

Dans la perspective du transfert à l'échelle industrielle des techniques citées ci-dessus, plusieurs stratégies peuvent être envisagées :

a) Extraction bi-vis multi-étagée : Un réacteur bi-vis présente l'avantage d'être compact et continu. Il a été utilisé pour sa capacité à enchaîner dans le même appareillage, trois opérations élémentaires : le mélange, l'extraction liquide/solide et la séparation liquide/solide. Il permet aussi la réduction de la taille des particules solides. L'action mécanique favorise le mélange intime du liquide et du solide, ce qui contribue donc à une amélioration de la mise en contact des constituants du mélange et par conséquent à de meilleurs rendements.

Le procédé multi-étagé (2 étapes en série) peut être envisagé sous deux angles. Il peut comprendre en tant que deuxième étape, ce qu'on peut appeler « le recyclage des extrudats » ou consister à la mise en œuvre de 2 zones de séparation liquide/solide distinctes sur le même extrudeur. En plus des avantages déjà mentionnés : extraction en continu et séparations liquide/solide dans l'extrudeur, d'autres paramètres peuvent être jugés comme appréciables : faible ratio L/S, faible %NaOH/MO_i et flexibilité sur les solvants utilisables. L'amélioration de l'efficacité de la solubilisation des composés phénoliques et de la filtration serait alors l'objectif principal pour valider le degré de faisabilité de l'extraction en bi-vis en deux étapes. Le transfert industriel est possible avec l'inconvénient majeur que d'un point de vue énergétique, l'extrusion bi-vis est une technologie gourmande.

b) Extraction MAE optimisée : l'extraction des composés phénoliques des coproduits de chanvre en MAE par le passage de l'échelle analytique à l'échelle pilote, semble être possible. Elle consisterait en une optimisation des différentes conditions opératoires ou facteurs pouvant l'influencer. L'évaluation de la mise à l'échelle industrielle de l'extraction MAE peut se faire soit par l'augmentation des volumes traités et dans ce cas, la puissance des micro-ondes et la durée de l'extraction seront les paramètres à étudier (Petigny et al. 2014; Filly et al. 2014) ; soit par un procédé d'extraction en continu et à échelle industrielle par augmentation du débit de matière et de la puissance du rayonnement et par la diminution de la fréquence des micro-ondes et de la durée de l'extraction (Terigar et al. 2011). La mise à l'échelle industrielle est basée sur les paramètres de l'extraction MAE optimisés. Il sera nécessaire dans le cas de notre étude, pour chaque coproduit et par l'intermédiaire des études cinétiques, de déterminer le % NaOH/MO_i, la puissance des micro-ondes et le ratio L/S permettant d'obtenir les rendements optimaux et de s'approcher des potentiels en PP, AF et ApC des conditions analytiques. Les rendements optimaux en composés phénoliques pourraient être aussi estimés par la réalisation d'un plan

d'expérience (par exemple factoriel complet 2^k) à 2 variables : le %NaOH/MO_i et la durée de l'extraction. Ce sont les deux facteurs influençant principalement l'extraction des composés phénoliques en milieu alcalin (Beejmohun et al. 2007). Ainsi, les autres paramètres resteraient constants et cela nous permettrait de prendre en compte les verrous technologiques de notre appareillage.

Donc, la mise à l'échelle industrielle de l'extraction peut être affectée par différents facteurs dont la fréquence qui est d'une importance particulière. La faible durée de l'extraction et la diminution du temps de chauffe et donc la diminution de la consommation de l'énergie et par conséquent du coût, rendraient cette technique très avantageuse par rapport aux techniques traditionnelles. Par contre, les inconvénients pouvant être notés sont : le ratio L/S élevé et par conséquent la quantité de solvant, et la séparation liquide/solide devant être considérée en post-traitement ce qui implique des coûts de production supérieurs.

Bien que les deux stratégies déjà présentées soient les plus viables à l'échelle industrielle, d'autres peuvent être proposées :

- c) Extraction bi-vis + extraction batch des extrudats
- d) Extraction bi-vis + extraction MAE des extrudats
- e) Extraction MAE + extraction batch des résidus solides.

Ces stratégies sont plus coûteuses. Elles comprennent deux étapes sans compter les étapes de séparation liquide/solide. Le ratio L/S, la durée et la quantité de réactifs s'avèrent être importants. L'optimisation des différentes étapes est nécessaire afin de diminuer les consommations accrues d'énergie et de solvant.

Parmi les acides phénoliques recherchés dans notre étude, l'acide férulique est fortement attaché à la structure lignocellulosique, ce qui rend son extraction difficile, à l'échelle industrielle comme à l'échelle analytique. Pour atteindre l'acide férulique éthérifié, il faudrait forcément durcir les conditions pour hydrolyser les liaisons éthers et donc s'attendre à des coûts énergétiques et chimiques supérieurs. Les possibilités envisageables pourraient être :

- L'extraction avec des concentrations élevées en réactif alcalin.

- Une étape de prétraitement permettant une meilleure déstructuration de la matière et une meilleure diffusion du solvant dans la matière, comme par exemple l'immersion dans le solvant riche en réactif, le traitement thermique combiné avec l'immersion dans le solvant adéquat, l'augmentation de la température d'extraction et/ou le broyage de la matière en amont.

A la lumière de ce qui a été présenté, plusieurs points devront faire l'objet d'investigations ultérieures afin d'optimiser la production en continu d'extraits riches en acides phénoliques d'intérêt à partir des coproduits du chanvre.

Parmi toutes les possibilités, la stratégie (a) est le seul cas concret étudié et validé au cours de notre étude et qui peut être facilement mis en œuvre en complétant le profil d'extraction en bi-vis avec des modules supplémentaires. Ce procédé en deux étapes présente un avantage par rapport aux méthodes conventionnelles et à la MAE: la diminution du ratio L/S et de la durée. La mise en place d'un second étage s'est avérée très intéressante en termes de rendements en acides phénoliques des extraits. Ce dernier procédé sera alors très efficace pour l'extraction de nos deux molécules d'intérêt : l'AF et l'ApC.

III. 4. Conclusion

L'efficacité de l'extraction assistée par micro-ondes et de l'extraction thermo-mécano-chimique a été étudiée pour l'extraction des composés phénoliques à partir des coproduits du chanvre. Les résultats obtenus ont permis de conclure sur la potentielle mise en œuvre d'un procédé innovant pour l'extraction optimisée des acides férulique et *p*-coumarique dans des conditions respectueuses de l'environnement.

Quel que soit le procédé, l'augmentation de la température n'influence pas a priori les rendements en composés phénoliques totaux pour les deux coproduits du chanvre.

Dans le cas de l'extraction continue en extrudeur bi-vis, le solvant hydro-alcoolique est le plus sélectif pour l'extraction des polyphénols de la chènevotte. En combinant les deux facteurs : soude et éthanol 60 %, le rendement en composés phénoliques totaux observé est maximal.

Néanmoins, même sous contrainte thermo-mécanique, l'extraction des acides phénoliques sans introduction d'un réactif chimique agissant sur la structure du végétal, n'est pas concluante dans le cas de la chènevotte. Le solvant hydro-alcoolique basique permet d'atteindre les rendements maximaux de 33 % du potentiel en acide férulique et 51 % du potentiel en acide *p*-coumarique.

Dans le cas de la poudre organique, l'effet du solvant d'extraction n'est pas significatif sur l'extraction des composés phénoliques totaux. Par contre, l'addition de soude triple les rendements d'extraction en polyphénols par son action d'hydrolyse chimique et de gonflement de la matière qui facilite la diffusion du solvant. Contrairement à la conclusion précédente, le solvant hydro-alcoolique présente une efficacité supérieure pour la solubilisation des acides phénoliques. La combinaison solvant hydro-alcoolique/NaOH a démontré, comme dans le cas de la chènevotte, le potentiel extractif le plus élevé. Elle conduit à des rendements en AF et Van inférieurs d'un facteur 2 à ceux obtenus par hydrolyse alcaline en batch. Par contre le rendement en *ApC* est équivalent au potentiel analytique.

Dans le cas de l'extraction MAE, en absence de réactif alcalin, aucun effet de la température ni du solvant d'extraction n'est observé.

Dans le cas de la chènevotte, une influence positive de la quantité de soude sur la rupture des liaisons chimiques et l'extraction des acides phénoliques a été démontrée.

Pour la poudre organique et en milieu basique, les rendements sont voisins quels que soient la concentration en soude ou le solvant. Les rendements en *ApC* sont équivalents à celui de l'hydrolyse alcaline en batch. Le rendement maximal en AF représente 60 % du potentiel de l'hydrolyse alcaline. La vanilline est très présente dans les extraits et elle dépasse le potentiel dans le cas d'une concentration en soude de 29 %/ MO_i .

En considérant la répartition des acides en fonction du type de liaison dans la structure lignocellulosique, l'extraction MAE permet donc d'atteindre les potentiels en *ApC* étherifiés et estérifiés et en AF estérifié. Optimiser les conditions d'extraction MAE pourrait conduire à atteindre les potentiels pour les deux acides phénoliques. Cette technologie pourrait alors représenter un atout analytique pour l'étude des potentiels en acides phénoliques de la matière végétale.

Pour les deux méthodes d'extraction, nous avons constaté que le solvant hydro-alcoolique alcalin conduisait aux rendements optimaux :

- en ApC par MAE et en AF par extrusion bi-vis pour la chènevotte.
- par extrusion bi-vis pour les acides phénoliques et la vanilline pour la poudre organique.

Finalement, après déstructuration réactive de la matière première et séparation liquide/solide dans l'extrudeur, il s'avère qu'une partie des molécules libérées reste retenue dans l'extrudat. Cette partie peut être récupérée dans une seconde étape d'extraction par un solvant polaire pour aboutir à une augmentation significative des rendements. Le potentiel défini par hydrolyse alcaline dure est ainsi dépassé pour l'ApC et la vanilline en cumulant les valeurs issues de l'extraction bi-vis et de l'extraction à reflux. Par contre, la quantité d'AF reste faible. Ainsi, l'extraction alcaline en extrudeur bi-vis, conduit à l'hydrolyse préférentielle des liaisons ester et à l'hydrolyse partielle des liaisons éther dont la rupture totale nécessiterait des conditions chimiques et/ou thermiques plus dures.

Une extraction multi-étagée en conditions alcalines douces sous contrainte thermo-mécanique continue, serait le processus le plus pertinent pour allier amélioration des rendements et intensification des procédés. Une étude plus complète des conditions d'extraction MAE serait nécessaire pour pouvoir conclure quant à la pertinence de l'utilisation de cette technologie pour l'extraction simultanée, en une seule étape des deux molécules d'intérêt : l'AF et l'ApC.

La concentration du filtrat ou la séparation des molécules d'intérêts est l'étape suivante nécessaire pour obtenir les acides phénoliques sous forme de composés isolés. Une étape innovante d'enrichissement, basée sur la mise en œuvre de zéolithes, a été explorée dans le Chapitre IV.

Enfin, tout schéma de fractionnement de la matière végétale doit prendre en compte les résidus solides de l'extraction. Dans ce schéma de fractionnement, il ne sera pas impossible de développer des alternatives pour la valorisation des extrudats afin de minimiser l'impact environnemental du procédé. Ces produits pourraient être, par exemple, valorisés dans l'industrie des agro-matériaux ou de l'énergie en tant que combustibles, ou alors revenir au sol pour les cultures.

III. 5. Références

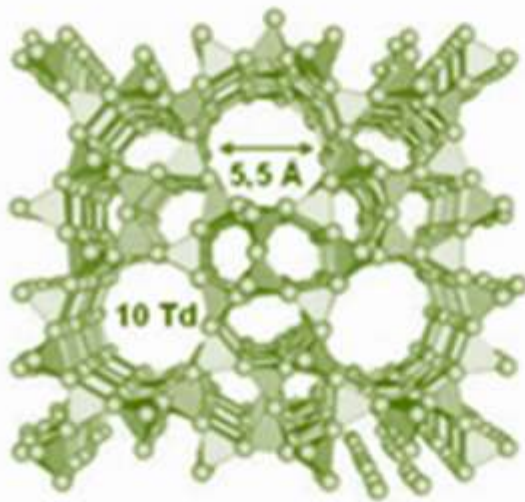
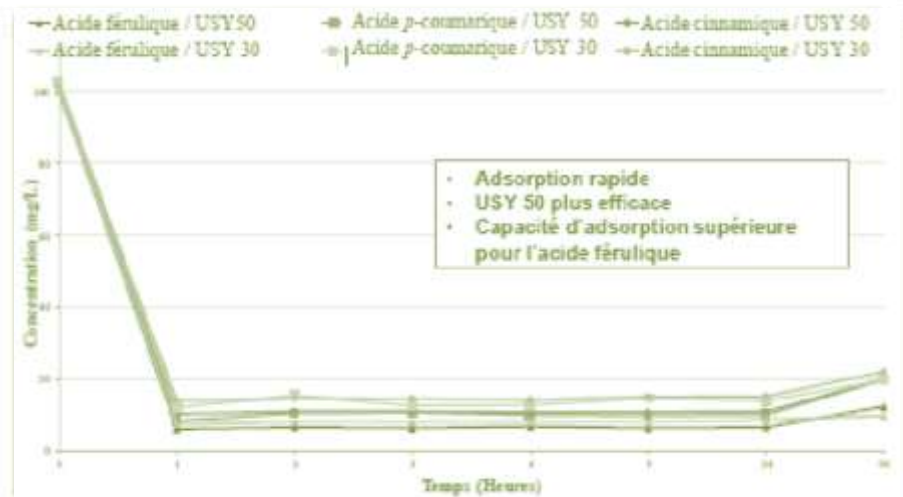
- Beejmohun, Vickram, Ophélie Fliniaux, Eric Grand, Frédéric Lamblin, Lamine Bensaddek, Philippe Christen, José Kovensky, Marc- André Fliniaux, François Mesnard. 2007. "Microwave-assisted Extraction of the Main Phenolic Compounds in Flaxseed." *Phytochemical Analysis* 18 (4): 275–82.
- Besombes, Colette, Baya Berka-Zougali, Karim Allaf. 2010. "Instant Controlled Pressure Drop Extraction of Lavandin Essential Oils: Fundamentals and Experimental Studies." *Journal of Chromatography A* 1217 (44): 6807–15.
- Celhay, Clément. 2013. "Fractionnement de Coproduits de Pin Maritime (Pinus Pinaster) et de Peuplier (Populus Tremula) Pour L'obtention D'extraits Polyphénoliques À Activité Antioxydante: Procédé D'extraction Aqueuse En Extracteur Bi-Vis et Étude Des Conditions Subcritiques." Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Chemat, Farid, Natacha Rombaut, Anne-Sylvie Fabiano-Tixier, Jean T Pierson, Antoine Bily. 2015. "Green Extraction: From Concepts to Research, Education, and Economical Opportunities." *Green Extraction of Natural Products: Theory and Practice*, 1–36.
- Chiremba, Constance, Lloyd W Rooney, Trust Beta. 2012. "Microwave-Assisted Extraction of Bound Phenolic Acids in Bran and Flour Fractions from Sorghum and Maize Cultivars Varying in Hardness." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (18): 4735–42.
- Dahmoune, Farid, Balunkeswar Nayak, Kamal Moussi, Hocine Remini, Khodir Madani. 2015. "Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Polyphenols from Myrtus Communis L. Leaves." *Food Chemistry* 166: 585–95.
- Dahmoune, Farid, Giorgia Spigno, Kamal Moussi, Hocine Remini, Asma Cherbal, Khodir Madani. 2014. "Pistacia Lentiscus Leaves as a Source of Phenolic Compounds: Microwave-Assisted Extraction Optimized and Compared with Ultrasound-Assisted and Conventional Solvent Extraction." *Industrial Crops and Products* 61: 31–40.
- Filly, Aurore, Xavier Fernandez, Matteo Minuti, Francesco Visinoni, Giancarlo Cravotto, Farid Chemat. 2014. "Solvent-Free Microwave Extraction of Essential Oil from Aromatic Herbs: From Laboratory to Pilot and Industrial Scale." *Food Chemistry* 150: 193–98.
- Hossain, Mohammad B, Nigel P Brunton, Ankit Patras, Brijesh Tiwari, CP O'Donnell, Ana B Martin-Diana, Catherine Barry-Ryan. 2012. "Optimization of Ultrasound Assisted Extraction of Antioxidant Compounds from Marjoram (Origanum Majorana L.) Using Response Surface Methodology." *Ultrasonics Sonochemistry* 19 (3): 582–90.
- Jacotet-Navarro, M, N Rombaut, AS Fabiano-Tixier, M Danguien, A Bily, F Chemat. 2015. "Ultrasound versus Microwave as Green Processes for Extraction of Rosmarinic, Carnosic and Ursolic Acids from Rosemary." *Ultrasonics Sonochemistry*.
- Jacquet, N, C Vanderghem, C Blecker, M Paquot. 2010. "La Steam Explosion: Application En Tant Que Prétraitement de La Matière Lignocellulosique." *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 14 (2): 561–66.
- Lachenal, D. 2006. "Economie Durable En Papetterie : La Technologie Bi-Vis Y Contribue." In *Congrès Scientifique Des 50 Ans Du Groupe Clextral*, 207–22. Saint-Etienne, France.
- Lagunez Rivera, Luicita. 2006. "Étude de L'extraction de Métabolites Secondaires de Différentes Matières Végétales En Réacteur Chauffé Par Induction Thermomagnétique Directe." Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Liu, Zhilan, Juan Wang, Pingniang Shen, Chengyun Wang, Yongjia Shen. 2006. "Microwave-Assisted Extraction and High-Speed Counter-Current Chromatography Purification of

- Ferulic Acid from Radix Angelicae Sinensis.” *Separation and Purification Technology* 52 (1): 18–21.
- Li, Yinping, George K Skouroumounis, Gordon M Elsey, Dennis K Taylor. 2011. “Microwave-Assistance Provides Very Rapid and Efficient Extraction of Grape Seed Polyphenols.” *Food Chemistry* 129 (2): 570–76.
- Magro, Christian. 1995. “Valorisation Des Pailles de Blé Par Fractionnement Thermo-Mécano-Chimique Dans Un Réacteur Bivis.” Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Mandal, Vivekananda, Yogesh Mohan, S Hemalatha. 2007. “Microwave Assisted Extraction-an Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research.” *Pharmacognosy Reviews* 1 (1): 7.
- Milutinović, Milica, Neda Radovanović, Mirjana Rajilić-Stojanović, Slavica Šiler-Marinković, Snežana Dimitrijević, Suzana Dimitrijević-Branković. 2014. “Microwave-Assisted Extraction for the Recovery of Antioxidants from Waste Equisetum Arvense.” *Industrial Crops and Products* 61: 388–97.
- N'Diaye, S, L Rigal. 2000. “Factors Influencing the Alkaline Extraction of Poplar Hemicelluloses in a Twin-Screw Reactor: Correlation with Specific Mechanical Energy and Residence Time Distribution of the Liquid Phase.” *Bioresource Technology* 75 (1): 13–18.
- Pan, Xuejun, Guoguang Niu, Huizhou Liu. 2003. “Microwave-Assisted Extraction of Tea Polyphenols and Tea Caffeine from Green Tea Leaves.” *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 42 (2): 129–33.
- Petigny, Loïc, Sandrine Périno, Matteo Minuti, Francesco Visinoni, Joël Wajsman, Farid Chemat. 2014. “Simultaneous Microwave Extraction and Separation of Volatile and Non-Volatile Organic Compounds of Boldo Leaves. From Lab to Industrial Scale.” *International Journal of Molecular Sciences* 15 (5): 7183–98.
- Prat, Laurent. 1998. “Modélisation d'un réacteur Thermo-Mecano-Chimique Bi-Vis utilisé en fractionnement de matière végétale.” Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Proestos, Charalampos, Michael Komaitis. 2008. “Application of Microwave-Assisted Extraction to the Fast Extraction of Plant Phenolic Compounds.” *LWT-Food Science and Technology* 41 (4): 652–59.
- Puértolas, E, N López, G Saldaña, I Álvarez, J Raso. 2010. “Evaluation of Phenolic Extraction during Fermentation of Red Grapes Treated by a Continuous Pulsed Electric Fields Process at Pilot-Plant Scale.” *Journal of Food Engineering* 98 (1): 120–25.
- Routray, Winny, Valérie Orsat. 2012. “Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review.” *Food and Bioprocess Technology* 5 (2): 409–24.
- Savoire, Raphaëlle, Jean-Louis Lanoisellé, Eugène Vorobiev. 2013. “Mechanical Continuous Oil Expression from Oilseeds: A Review.” *Food and Bioprocess Technology* 6 (1): 1–16.
- Terigar, BG, S Balasubramanian, CM Sabliov, M Lima, D Boldor. 2011. “Soybean and Rice Bran Oil Extraction in a Continuous Microwave System: From Laboratory-to Pilot-Scale.” *Journal of Food Engineering* 104 (2): 208–17.
- Tsubaki, S, Y Ozaki, J Azuma. 2010. “Microwave- Assisted Autohydrolysis of Prunus Mume Stone for Extraction of Polysaccharides and Phenolic Compounds.” *Journal of Food Science* 75 (2): C152–59.
- Tsubaki, S, Masahiro Sakamoto, Jun-ichi Azuma. 2010. “Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Tea Residues under Autohydrolytic Conditions.” *Food Chemistry* 123 (4): 1255–58.

- Vandenbossche, Virginie, Catherine Doumeng, Luc Rigal. 2014. "Thermomechanical and Thermo-Mechano-Chemical Pretreatment of Wheat Straw Using a Twin-Screw Extruder." *BioResources* 9 (1): 1519–38.
- Veggi, Priscilla C, Julian Martinez, M Angela A Meireles. 2012. "Fundamentals of Microwave Extraction." In *Microwave-Assisted Extraction for Bioactive Compounds*, 15–52. Springer.
- Wang, Lijun, Curtis L Weller. 2006. "Recent Advances in Extraction of Nutraceuticals from Plants." *Trends in Food Science & Technology* 17 (6): 300–312.

Chapitre IV:

Concentration des extraits via l'utilisation de zéolithes



IV. 1. Résumé

De nombreuses études mettent en œuvre des méthodes d'extraction de composés phénoliques/acides hydroxycinnamiques ainsi que des méthodes de concentration/purification des extraits afin de les valoriser. L'enrichissement des extraits peut être mis en œuvre notamment par adsorption *via* différents types d'adsorbant (§ I.5).

L'objectif de l'étude consiste à tester différents solides microporeux pour évaluer la pertinence de leur utilisation dans une étape innovante de purification/concentration d'extraits de chènevotte et de poussières organiques afin de pouvoir valoriser des monomères aromatiques à haute valeur ajoutée. Cette étude de faisabilité a été menée en collaboration avec l'équipe Matériaux à porosité contrôlée de l'Institut des Sciences et Matériaux de Mulhouse (IS2M) (UMR CNRS 7361).

Dans un premier temps, la capacité d'adsorption d'acides hydroxycinnamiques (acide férulique, acide *p*-coumarique, acide cinnamique) a été étudiée en batch sur des zéolithes de type FAU et *BEA en comparaison avec une résine Amberlite XAD16 à partir de solutions modèles. L'influence du pH et du temps de contact sur l'adsorption a été évaluée. La capacité d'adsorption est dépendante du pH et est plus élevée pour des valeurs de pH inférieures à pK_{a1} . D'autre part, la cinétique d'adsorption est plus rapide pour les zéolithes (*BEA et FAU) que pour la résine XAD16. Les capacités maximales d'adsorption ont été calculées pour un pH de 3,5 à partir de l'utilisation du modèle de Langmuir. Pour les zéolithes, elles atteignent respectivement des valeurs de 139, 122 et 109 mg g⁻¹ pour l'acide férulique, l'acide *p*-coumarique et l'acide cinnamique, alors que des valeurs d'environ 30 mg g⁻¹ sont observées pour la résine XAD16. Les taux de désorption sont de manière générale plus élevés avec l'éthanol 96% qu'avec l'éthanol 70% et sont proches de 100% pour les trois molécules ciblées avec la zéolithe *BEA. Une régénération des adsorbants est envisageable. Des tests ont été mis en œuvre pour évaluer les performances sur des extraits végétaux obtenus à partir d'extraction microondes et extrusion bi-vis. La zéolithe de structure *BEA est l'adsorbant qui, parmi ceux étudiés, présente les résultats les plus prometteurs.

Les résultats sont présentés sous la forme d'un article publié dans la revue *Chemical Engineering Journal* (2015).

IV. 2. Recovery of hydroxycinnamic acids from renewable resources by adsorption on zeolites

Chemical Engineering Journal 280 (2015) 748–754



Contents lists available at ScienceDirect

Chemical Engineering Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cejChemical
Engineering
Journal

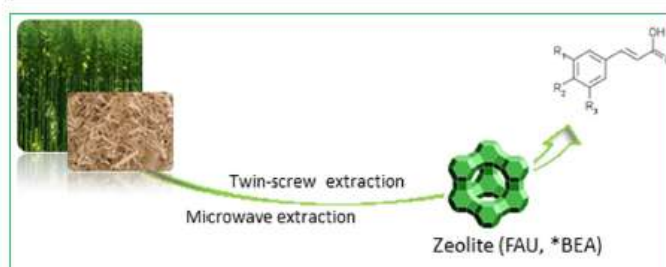
Recovery of hydroxycinnamic acids from renewable resources by adsorption on zeolites

V. Simon ^{a,b,*}, A. Thuret ^{a,b}, L. Candy ^{a,b}, S. Bassil ^{a,b}, S. Duthen ^{a,b}, C. Raynaud ^{a,b}, A. Masseron ^c^a Université de Toulouse, INPT, LCA (Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle), ENSIACET, 4 Allée Emile Monso, 31030 Toulouse, France^b INRA, LCA (Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle), ENSIACET, 31030 Toulouse, France^c Université de Strasbourg, Université de Haute Alsace, Equipe Matériaux à Porosité Contrôlée (MPC), Institut de Science des Matériaux de Mulhouse (IS2M), UMR CNRS 7361 UHA, ENSCM, 3 bis rue Alfred Werner, 68093 Mulhouse Cedex, France

HIGHLIGHTS

- Adsorption of hydroxycinnamic acids is quantified onto FAU- and [®]BEA-type structures.
- Zeolites have higher adsorption capacities than those of polymer resin XAD16.
- Zeolites can be regenerated and reused in the extraction.
- Zeolites can be used to concentrate plant extracts.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 March 2015

Received in revised form 2 June 2015

Accepted 3 June 2015

Available online 18 June 2015

Keywords:

Ferulic acid
 p-Coumaric acid
 Cinnamic acid
 Adsorption
 Renewable resources
 Zeolite

ABSTRACT

The aim of the study was to examine the adsorption capacity of hydroxycinnamic compounds (ferulic acid, p-coumaric acid, cinnamic acid) on zeolite adsorbents (FAU- and [®]BEA-type structures) versus Amberlite resin XAD16. The pH and contact time effects on adsorption were evaluated. The adsorption capacity was dependent on pH and higher at pH less than pK_{a1}. The kinetic adsorption is faster onto FAU and [®]BEA zeolites than onto XAD16 resin. Maximum adsorption capacities were calculated for the target compounds for pH = 3.5 by using the Langmuir isotherm model. They reached higher values for zeolites than for XAD16 and are respectively of 139, 122 and 109 mg g⁻¹ for ferulic, p-coumaric and cinnamic acids. Values around 30 mg g⁻¹ were observed for XAD16. Desorption ratios were close to 100% for [®]BEA zeolite and XAD16 resin in the presence of ethanol 96%. The use of regenerated zeolites led to a loss of adsorption capacities of 10% for [®]BEA zeolite. The latter is a particularly interesting adsorbent to isolate the hydroxycinnamic compounds from vegetal extracts.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The concept of biorefinery is more and more present and we attend a strong political and technical focus on the energy valuation of the biomass under its various forms. The industrial transformation processes of the major vegetable productions generate significant amounts of by-products, which can often find use as sources of molecules with high added value for biobased

* Corresponding author at: Université de Toulouse, INPT, LCA (Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle), ENSIACET, 4 Allée Emile Monso, 31030 Toulouse, France. Tel.: +33 5 34323552.

E-mail address: valeriesimon@ensiacet.fr (V. Simon).

Recovery of hydroxycinnamic acids from renewable resources by adsorption on zeolites

V. Simon^{a,b*}, A. Thuret^{a,b}, L. Candy^{a,b}, S. Bassil^{a,b}, S. Duthen^{a,b}, C. Raynaud^{a,b}, A. Masseron^c

^a Université de Toulouse, INPT, LCA (Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle), ENSIACET, 4 Allée Emile Monso, 31030 Toulouse, France

^b INRA, LCA (Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle), ENSIACET, 31030 Toulouse, France

^c Université de Strasbourg, Université de Haute Alsace, Equipe Matériaux à Porosité Contrôlée (MPC), Institut de Science des Matériaux de Mulhouse (IS2M), UMR CNRS 7361 UHA, ENSCMu, 3 bis rue Alfred Werner, 68093 Mulhouse Cedex, France

* Corresponding author: valerie.simon@ensiacet.fr

Abstract

The aim of the study was to examine the adsorption capacity of hydroxycinnamic compounds (ferulic acid, *p*-coumaric acid, cinnamic acid) on zeolite adsorbents (FAU- and *BEA-type structures) *versus* Amberlite resin XAD16. The pH and contact time effects on adsorption were evaluated. The adsorption capacity was dependent on pH and higher at pH less than pK_{a1}. The kinetic adsorption is faster onto FAU and *BEA zeolites than onto XAD16 resin. Maximum adsorption capacities were calculated for the target compounds for pH=3.5 by using the Langmuir isotherm model. They reached higher values for zeolites than for XAD16 and are respectively of 139, 122 and 109 mg g⁻¹ for ferulic, *p*-coumaric and cinnamic acids. Values around 30 mg g⁻¹ were observed for XAD16. Desorption ratios were close to 100 % for *BEA zeolite and XAD16 resin in the presence of ethanol 96 %. The use of regenerated zeolites led to a loss of adsorption capacities of 10% for *BEA zeolite. The latter is a particularly interesting adsorbent to isolate the hydroxycinnamic compounds from vegetal extract.

1. Introduction

The concept of biorefinery is more and more present and we attend a strong political and technical focus on the energy valuation of the biomass under its various forms. The industrial transformation processes of the major vegetable productions generate significant amounts of by-products, which can often find use as sources of molecules with high added value for biobased chemicals. Secondary plant metabolites like hydroxycinnamic compounds have received a lot of attention in recent years. This class of naturally occurring compounds has a particular interest for industry because of their high antioxidative, antimicrobial, anti-inflammatory and antiviral activities linked to their free radical-scavenging properties [1-4]. Solvent extraction is a conventional established technique for the recovery of hydroxycinnamics, but its selectivity is poor and the recoveries are often low. Further purification and concentration are required, involving additional costs and generation of wastes. The environmental problems caused by solvents have favored the development of simpler, selective, efficient and environmentally friendly technologies.

The technologies dedicated to the recovery and purification of bioactive compounds from natural effluents and biowastes are under implementation. The recovery of hydroxycinnamic

compounds was mostly proposed by membrane processes and liquid–liquid extraction, semi-preparative HPLC, adsorption, solid phase extraction (SPE) with diverse resins (Amberlite XAD7, XAD16,...) [5-12]. Adsorption enables the separation of selected compounds from dilute solutions. Compared to alternative technologies, adsorption is attractive for its relative ease of design, operation and scale up, high capacity, ease of regeneration and low cost. It is the preferred method for phenolic compounds recovery. But a disadvantage of adsorbents is that they have either adsorption or high desorption performance but not both simultaneously. Zeolites, used to remove traces of hydroxycinnamic compounds from wastewater [13-14] could represent a feasible alternative compared with the traditional adsorbants, since it relies on simple, effective and cheap procedures [15].

In this context, the aim of this work is to characterize the adsorption and desorption of three hydroxycinnamic compounds (*p*-coumaric acid, ferulic acid, cinnamic acid) frequently present in plant extracts [16-18] onto zeolites of different characteristics in comparison with a styrenedivinylbenzene-based resin: Amberlite XAD16 which is already employed in recovery of phenolic compounds from agricultural wastes [19-21].

Batch adsorption and desorption experiments were first conducted with synthetic solutions of the target components. The property of the adsorbents was then evaluated in extracts obtained from renewable resources. Extracts from hemp wood, an important industrial hemp by-product, were selected for the present study to validate the possibility of using these materials for industrial scale valorization of hydroxycinnamic compounds.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals

Gallic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, cinnamic acid, acetonitrile and ethanol (HPLC grade), orthophosphoric acid and sodium hydroxide (99% purity) were purchased from Sigma Aldrich (L'Isle d'Abeau, France). Folin reagent and sodium carbonate are from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). HCl is from Fisher Chemical (Illkirch, France). Ultrapure water was prepared using a Milli-Q filter system (Millipore, Bedford, MA, USA).

The main physical characteristics of the target compounds are listed in Table 1.

2.2 Preparation and characterization of adsorbent

FAU and *BEA-type zeolites are selected for their pore size (Table 2) and they are used in their H⁺ form. USY30 and USY50 (FAU-type structure) are purchased from Süd-Chemie AG (München, Germany) and BETA (*BEA-type structure) from Clariant (München, Germany). The Amberlite XAD16 resin is purchased from Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau, France) as macroporous polystyrene crosslinked polymers. Their characteristics are reported in Table 2. Nitrogen sorption isotherms are carried out with a Micromeritics ASAP 2040 apparatus at liquid nitrogen temperature (77K). Equivalent specific surface areas are calculated using the BET equation. Prior to the measurement, the zeolite samples are outgassed under vacuum at 300°C overnight.

Before the use, zeolites were dried at 140°C during 36 h. Amberlite XAD16 resin was soaked in methanol for 10 min and then washed with ultra-pure water under agitation during 1 h. It was then dried in an oven during 24 h at 100°C.

Table 1.
Main characteristics of the target compounds.

Compounds	Formula	M (g mol ⁻¹)	pKa	Molecular size (nm)*
<i>p</i> -Coumaric acid	C ₉ H ₈ O ₃	164.16	4.64, 9.45	0.500 × 1.024
Ferulic acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194.19	4.58, 8.75	0.500 × 1.000
Cinnamic acid	C ₉ H ₈ O ₂	148.16	4.44	0.499 × 0.945

* calculated with Hyperchem software.

Table 2.
Characteristics of the adsorbents.

Adsorbent	Pore size (nm)	Molar ratio Si/Al	BET surface (m ² g ⁻¹)
USY30	0.74 ^a	14.5	749 ^c
USY50	0.74 ^a	25	675 ^c
BETA	0.66 × 0.67 ^a 0.56 × 0.56 ^a	88	659 ^c
Zeolite A ^b	0.64 ^b	70 ^b	543 ^b
XAD16	-		≥ 800

^a Atlas of zeolite framework types [22]

^b [15]. Not studied in this work, but cited in §3.

^c Determined in this work.

2.3 Plant material

Hemp wood is a hemp by-product generated during the industrial processing of the fiber. Its lignin content (~ 20 %) is very close to that of wood [23]. So is this material a potential source of aromatic compounds. Hemp wood was provided by Agrofibre (Cazères-sur-Garonne, France). It was milled in 0.5 mm particles before the implementation of the extraction process. For characterization of the dry matter, the crucibles are subjected beforehand to a temperature of 103°C for a few hours in an oven, then placed in a desiccator. Once cooled, their mass is measured. 2 g of extract were then placed in the crucible, which is placed in an oven at 103 °C for 12 hours minimum. Monitoring the mass is carried out until a stabilization of the value. The percentage of dry matter is then determined by the following relationship:

$$\% \text{ dry weight} = \frac{\text{final weight}}{\text{initial weight}} * 100 \quad (1)$$

2.4 Extraction processes

Extracts obtained by microwave extraction and twin-screw extraction were studied.

The microwave extractions were performed in an oven MARS 5 from CEM instruments according to operating conditions developed by Bassil [24]. The samples consist of a quantity of hemp wood and extraction solvent in a liquid / solid ratio 1:16. The extraction solvent used is 96% ethanol. 14 g of dry hemp wood were extracted with 224 g of solvent. The extraction temperature ranged from 25 to 80 °C in 7 min and was maintained for 3 min (Microwave power: 1000W. Pressure and temperature values were of 12 bar and 80°C. The extracts are then centrifuged for 15 min at 20°C (9000 rpm), and the liquid phase is recovered. The ethanol was removed under vacuum at 43°C, and the extract is taken up in ultra- pure water. This step is necessary because the contact with the zeolites should be in an aqueous solution, not ethanolic one, because ethanol interferes in the interactions between the hydroxycinnamic compounds and the adsorbent [15].

Extractions were also conducted with a co-rotating and co-penetrating Clextrel BC 45 (Firminy, France) twin-screw extruder according to operating conditions developed by Bassil [23]. Hemp wood and water were fed into the twin-screw extractor (Clextrel 40, France): solvent/solid ratio 3:5. A filter consisting of six hemispherical units with perforations of 1 mm in diameter, was used to separate the liquid and the solid phases. The phase liquid was recovered, centrifuged to eliminate residual fine particles.

The concentration in total phenolics (mg g⁻¹) of the extracts is determined by the Folin - Ciocalteu titration.

2.5 Batch adsorption

About 50 mg of adsorbent and 10 mL of aqueous solution of hydroxycinnamic acids with the same initial concentrations C_0 from 10 to 500 mg L⁻¹ were placed in 50 mL glass flask under agitation at room temperature (24°C ± 2°C). This domain of concentrations includes the real concentrations of the plant extracts and allows to realize adsorption isotherms. Parallel blank experiments were carried out by adding 10 mL of the aqueous solution in identical glass flask without adsorbent. Two replicates were set up for each experiment.

Initially, the experiments are carried out with aqueous model solutions made up with known concentrations of *p*-coumaric acid, ferulic acid and cinnamic acid C_0 (mg L⁻¹). Tests were carried out by changing the pH of the solutions by the addition of HCl or NaOH. Tests are then conducted on plant extracts. At different time, the concentration C_t (mg L⁻¹) of solution was determined by HPLC with UV detection. Samples (200 µL) are made over a period of 24 hours.

The adsorption capacity (Q) was calculated according to the following equation:

$$Q = \frac{V(C_0 - C_t)}{w} \quad (2)$$

where Q (mg g^{-1}) is the adsorption capacity; V (L) is the volume of the solution; w (g) is the adsorbent dry weight.

After reaching the adsorption equilibrium, the equilibrium concentration (C_e) was determined. The equilibrium adsorption capacity (Q_e) was calculated according to the following equation:

$$Q_e = \frac{V(C_0 - C_e)}{w} \quad (3)$$

Adsorption ratios (A , %) were calculated as follows:

$$A = \frac{C_0 - C_e}{C_0} * 100 \quad (4)$$

2.6 Determination of phenolic content

2.6.1. HPLC analysis

Qualitative and quantitative analysis of hydroxycinnamic compounds were achieved *via* HPLC-DAD reverse phase system (DIONEX Ultimate 3000 HPLC) operating at 280 and 320 nm wavelengths and equipped with a Omnispher C18 (3 μm) 3 mm \times 100 mm column (Varian, France). Column temperature was maintained at 30°C at a flow rate of 0.7 mL min⁻¹. Injection volume was 10 μL . The employed eluents were pure water acidified by orthophosphoric acid (pH=2) (A) and pure acetonitrile (B). The gradient was: 0–5 min 95% A, 5–10 min 90% A, 10–17 min 72% A, 17–22 min 0% A, 22–24 min 0% A, 24–28 min 95% A. Calibration curves were prepared at 6 levels (0, 10, 50, 100, 200, 500 mg L⁻¹) and each calibration level was injected in triplicate. The linearity range extends in the whole calibration curve with regression coefficients from 0.9990 (*p*-coumaric acid) to 0.9995 (ferulic acid). To study the repeatability of the analysis, a standard solution containing low hydroxycinnamic concentrations (10 mg L⁻¹) was injected 10 times. The standard deviation, determined for each compound appeared to be lower than 5%.

Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were estimated as equal to 3 times the background ($S/N = 3$) and the LOQ as 10 times the background ($S/N = 10$) [25]. The quantification limits are for ferulic acid, *p*-coumaric acid and cinnamic acid respectively 1.7, 1.4 and 0.4 mg L⁻¹.

The concentration of each component was calculated using a calibration curve from the corresponding synthetic solution.

2.6.2. Determination of polyphenol content

The concentrations of total polyphenol content were determined using the Folin-Ciocalteu (FC) method. 1 mL sample, 7.5 mL distilled water, 1 mL sodium carbonate (20%), and 0.5 mL FC reagent were mixed at 70°C for 10 min. Absorbances were then measured at 760 nm (UV-1800 spectrophotometer, Shimadzu) against a blank sample at 23°C. Determination of

the total phenolic compound content was performed in triplicate and calculated using a calibration curve with gallic acid as a standard. The results were expressed in gallic acid equivalent (mg GAE g⁻¹).

2.7. Desorption

Recovery of adsorbed compounds was studied in desorption experiments carried out with the exhausted adsorbents employed in adsorption experiments (Table 2). After adsorption, the remaining mixture was spin-dried (10500 g, 10 min at 20°C). The solid was removed, then dried in an oven at 60°C during 24 h and introduced into 2 mL of a non-toxic desorbing solvent: ethanol 70% or ethanol 96%. The solution was shaken in a thermomixer at 60°C for 3h at 1300 rpm. Each experiment was realized in triplicate. Desorption ratios (D, %) were calculated for each compound by the following equation:

$$D = \frac{C_d * V_d}{(C_0 - C_e) * V} \quad (5)$$

where C_d (mg L⁻¹) is the final concentration of the compound in the solvent and V_d (L) the employed solvent volume.

2.8. Regeneration process

After desorption, zeolites and resin were regenerated as described in §2.2. They are then used according to the protocol described in §2.5.

3. Results and discussion

3.1. Kinetic adsorption curve

Examples of kinetic adsorption curves are shown in Fig. 1. Changes in the ferulic acid adsorption capacity (Fig. 1a) are comparable for the three zeolites and reached higher adsorption rates than resin. For this adsorbent, adsorption kinetics are much slower: the equilibrium is reached after a contact time of about 8h *versus* 0.5h for zeolites. The adsorption capacity at the equilibrium for ferulic acid onto BETA (100 mg g⁻¹) is higher than for other adsorbents, such as USY50 and USY30 (86 mg g⁻¹) and XAD16 (19 mg g⁻¹).

The adsorption reached equilibrium at 0.5 h for BETA zeolite, and the adsorption capacity reached the same order of magnitude for the three compounds (Fig. 1b) (for *p*-coumaric acid and cinnamic acid: 96 mg g⁻¹, and for ferulic acid: 100 mg g⁻¹). In the first 2 h, the adsorption ratio reached more than 94 % for the hydroxycinnamic acids with BETA zeolite (Fig. 2). Adsorption rates for ferulic and cinnamic acids are between 77 and 87% with USY zeolites while was only 40-50% for coumaric acid. Much lower values are recorded for XAD16 resin for which only cinnamic acid is adsorbed in significant amounts (A ~ 70%).

Contact times of 2 and 10 h were chosen for the selected range of concentrations to establish adsorption isotherms of zeolites and XAD16 resin respectively because an increased initial

concentration induces a longer required time from the beginning to the equilibrium as a larger equilibrium adsorption capacity.

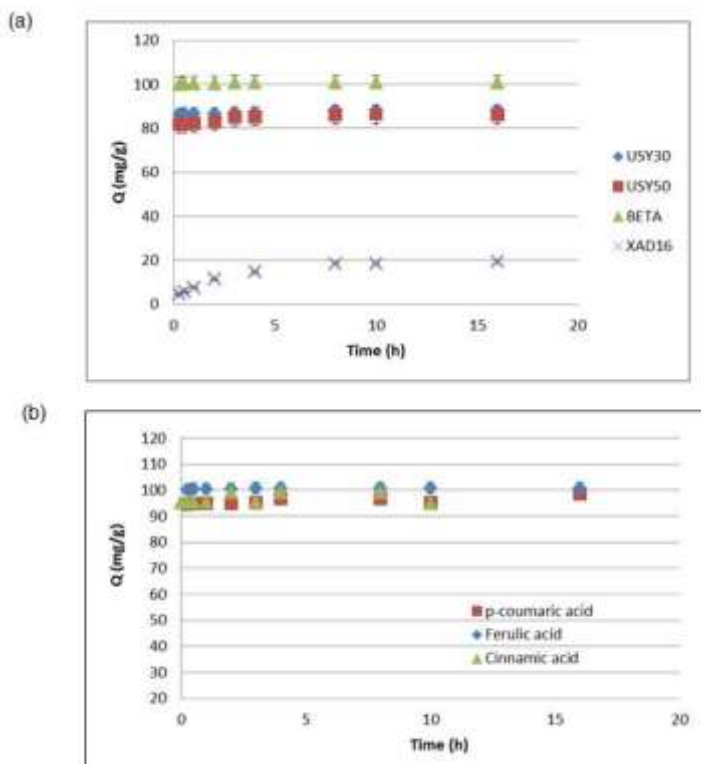


Fig. 1. Kinetic adsorption curves of (a) ferulic acid-USY/BETA/XAD16 and (b) hydroxycinnamic acids-BETA ($C_i = 200 \text{ mg L}^{-1}$, $m = 50 \text{ mg}$, $24 \pm 2^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 3.5$).

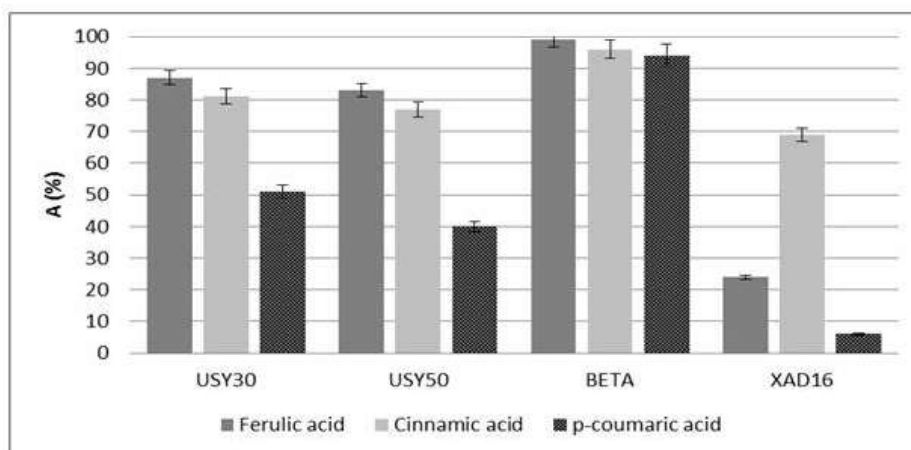


Fig. 2. Adsorption ratios for USY/BETA/XAD16 adsorbents (Adsorption time: 2 hr, $C_i = 200 \text{ mg L}^{-1}$, $m = 50 \text{ mg}$, $24 \pm 2^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 3.5$).

3.2. Adsorption isotherm

Adsorption isotherm reflects the relationship between the amount of a solute adsorbed at constant temperature and its concentration in the equilibrium solution. It provides essential physicochemical data for assessing the applicability of the adsorption. Langmuir and Freundlich isotherm models are widely used to investigate the adsorption process [6, 15, 21, 26]. The Langmuir isotherm was developed on the assumption that the adsorption process will only take place at specific homogenous sites within the adsorbent surface with uniform

distribution of energy level. Once the adsorbate is attached on the site, no further adsorption can take place at that site; which concluded that the adsorption process is monolayer in nature. Contrary to Langmuir, Freundlich isotherm was based on the assumption that the adsorption occurs on heterogeneous sites with non-uniform distribution of energy level. The Freundlich describes reversible adsorption and is not restricted to the formation of monolayer [27-28]. The linear form of Langmuir and Freundlich equations are represented respectively by the following equations:

$$\frac{C_e}{Q_e} = \frac{C_e}{Q_m} + \frac{1}{bQ_m} \quad (6)$$

$$\ln Q_e = \ln k + \frac{1}{n} \ln C_e \quad (7)$$

where Q_e is the amount of compound adsorbed at equilibrium (mg g^{-1}), C_e the equilibrium concentration of the adsorbate (mg L^{-1}), Q_m (mg g^{-1}) the saturated adsorption capacity, b the Langmuir constant, k and n the Freundlich constants.

Both models were employed to fit the experimental data. The maximum adsorption capacities of the studied adsorbent systems are presented in Table 3. On the bases of r^2 values, the Langmuir model described better the adsorption of each compound on all the tested adsorbents. Comparing the results, it is clear that the Amberlite adsorbent is less effective than the zeolites. The values are systematically 3.5 to 5 times lower than the highest adsorption rate. For example, the maximum adsorption capacity of ferulic acid is 139 mg g^{-1} for BETA and 29 for XAD16. USY30 and USY50 reach similar capacities with values around 133 mg g^{-1} . For coumaric acid and cinnamic acid, smaller values were obtained. They have been estimated for coumaric acid at respectively 68, 109 and 122 mg g^{-1} for USY50, USY30 and BETA.

BETA zeolite gives the best adsorption performances for ferulic and coumaric acids (Fig. 3) since the slope of their isotherm was significantly higher than those of the other adsorbents. On the other hand, they reach equilibrium at lower concentration values than other adsorbents ($\sim 0.2\text{-}0.3 \text{ g L}^{-1}$ for BETA and $> 0.8 \text{ g L}^{-1}$ for USY30 and USY50). In comparison, BETA zeolite has higher capacities at low concentrations than the others and a higher affinity for phenolic acids. Thiel et al [15] also studied the adsorption capacity of hydroxycinnamic acids for BETA zeolite (with a close Si/ Al ratio (Table 2)) and concluded that BETA zeolite was effective for this purpose and that adsorption values were higher for ferulic than for *p*-coumaric acid. Their results differ from $\pm 30 \%$ from the ones presented in this study. Let us note that the adsorption temperature is not quantitatively specified. It is then confirmed that zeolites adsorbents are particularly suitable for the recovery of targeted molecules, specifically the BETA zeolite. Its implementation requires a smaller amount of adsorbent compared to other adsorbents.

Table 3.

Estimated Langmuir and Freundlich equation parameters related to the adsorption of each hydroxycinnamic compound on the tested adsorbents.

	Langmuir					Freundlich			
	USY30	USY50	BEA	XAD16		USY30	USY50	BEA	XAD16
Coumaric acid									
Q_m (mg g ⁻¹)	108.7	68.0	122.0	34.2	k	133.49	76.93	149.25	28.21
b (L g ⁻¹)	5.8	11.3	82	3.2	1/n	0.584	0.382	0.235	0.452
r ²	0.953	0.998	0.998	0.983	r ²	0.882	0.921	0.866	0.991
Ferulic acid									
Q_m (mg g ⁻¹)	137.0	131.6	138.9	29.4	k	97.73	79.38	182.02	24.46
b (L g ⁻¹)	1.33	1.2	144.0	3.3	1/n	0.803	0.763	0.236	0.461
r ²	0.900	0.938	0.999	0.993	r ²	0.973	0.984	0.870	0.983
Cinnamic acid									
Q_m (mg g ⁻¹)		65.8	108.7	31.2	k		67.4	105.7	27.8
b (L g ⁻¹)	ND	8.44	153.33	3.57	1/n	ND	0.388	0.115	0.6171
r ²		0.903	0.999	0.983	r ²		0.903	0.953	0.955

3.3. The influence of pH value on adsorption capacity

A decrease of the maximal adsorption capacity of *p*-coumaric acid was observed for BETA zeolite according to the pH increase (Fig. 4). A factor 6 is approximately observed between pH 3 and pH 8-10. The pH of the solution influences the surface charge of the adsorbents as well as the degree of ionization of the adsorbate (Fig. 5). At pH < pK_{a1}, the phenolic compound is predominantly in the neutral molecular form, while the zeolite surface charge is positive for acid pH as reported by Kuzniatsova et al [30]. It results from the protonation or dissociation of the hydroxyl groups (SiOH and AlOH). Thus complexes are probably formed involving silanol and aluminol sites of zeolite and hydroxyl and carboxyl groups of the phenolic compound [31-32]. At pK_{a2} > pH > pK_{a1}, the compound is mainly in the form of negatively charged carboxylate ions and at pH > pK_{a2} the form of negatively charged phenolate ion is added. As the functional groups of the zeolite surface are deprotonated and negatively charged, electrostatic repulsive forces lead to a decrease of the adsorption capacity.

A decrease of the maximum adsorption capacity as a function of pH was also observed for ferulic and cinnamic acids with the three zeolites under study. The turning point is around 4.5 and relevant with the pK_{a1} value. The effect of pH upon adsorption of phenolic compounds has already been related to the degree of ionization of the phenolic sorbate by various authors [33-34]. Davila-Guzman et al [29] also demonstrated that the adsorption capacity of ferulic acid decreased with a pH increase for XAD16. Working at an acidic pH lower than pK_{a1} will promote the recovering of the maximum of molecules in an aqueous medium.

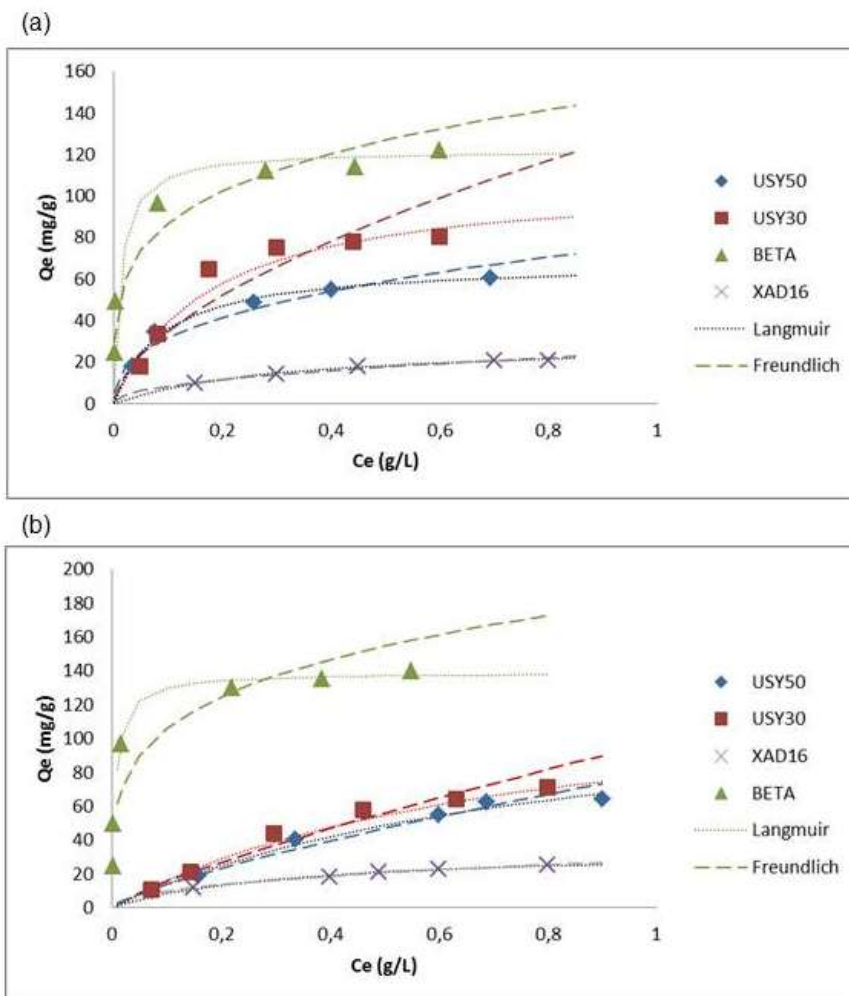


Fig. 3. Adsorption isotherms of *p*-coumaric acid (a) and ferulic acid (b) for USY50/USY30/BETA/XAD16 (Temperature: $24 \pm 2^\circ\text{C}$, Adsorption time: 2h except for XAD16 10h, pH=3.5).

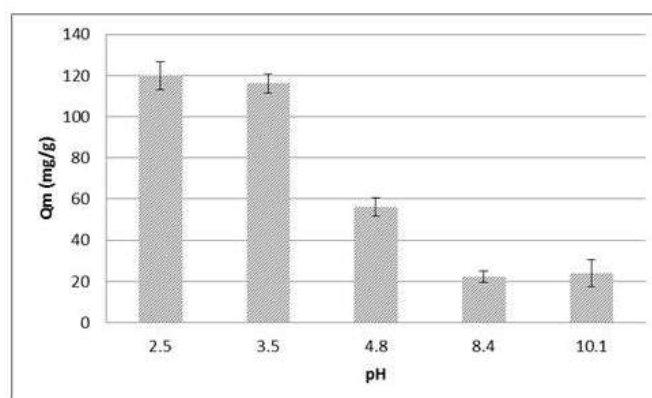


Fig. 4. Influence of pH on maximum adsorption capacity of *p*-coumaric acid on *BEA.

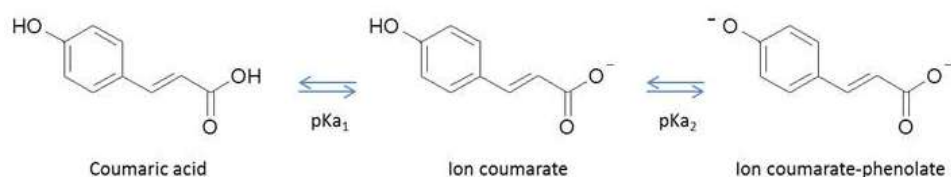


Fig. 5. Chemical equilibrium of *p*-coumaric acid ($\text{pK}_{a1} = 4.64$, $\text{pK}_{a2} = 9.45$).

3.4. Desorption experiments

The desorption rates of ferulic and *p*-coumaric acids are between 10 and 20% whatever the ethanol concentration of the extraction solvent for faujasites (Fig. 6). However, they vary between 71% and 100% for cinnamic acid. It is interesting to note that desorption with ethanol 96% allows to selectively desorb cinnamic acid trapped by the USY zeolites. The implication of OH_{phenolic} for adsorption of coumaric and ferulic acid creates another adsorption possibility that does not exist in cinnamic acid and strengthens the interactions with the zeolite.

The desorption rates are much higher for the BETA zeolite (close to 100%) and of the same order of magnitude as those obtained by Thiel et al [15] for ferulic acid. Desorption is easier in the case of BETA zeolite. This could be explained by the Si /Al ratio of zeolite and/or by the zeolite structure. Those of FAU-type structure (USY) have a porosity in the form of cavity while the pores of the BETA zeolite (* BEA-type structure) are in the form of channels [35]. Concerning the XAD16 resin, the use of ethanol 96% leads to results close to those obtained for the BETA zeolite.

Cinnamic acid is then the compound for which the desorption yields are the highest. This molecule is the less polar among the 3 studied. Furthermore, ethanol 96% provides the highest rate desorption rate. The protocol provides 10-fold concentrated extracts by using of the BETA zeolite.

3.5 Application to hemp wood extracts

Hydroxycinnamic compounds in aqueous extract from hemp wood have been quantified by HPLC-DAD. *p*-coumaric acid is the most abundant among the targeted acids [23, 35]. The total polyphenol content in microwave and twin screw extracts were respectively 65 and 896 mg GAE L⁻¹. The presence of other phenolic compounds and more generally organic/inorganic compounds in the extracts, does not seem to affect the adsorption of *p*-coumaric acid. Moreover, desorption rates obtained by ethanol 96% are equivalent to those presented in Fig. 6. Similar conclusions could be drawn for the spiked hemp extract (Table 4). The experimental results obtained with synthetic solutions can be applied to the hemp wood extracts

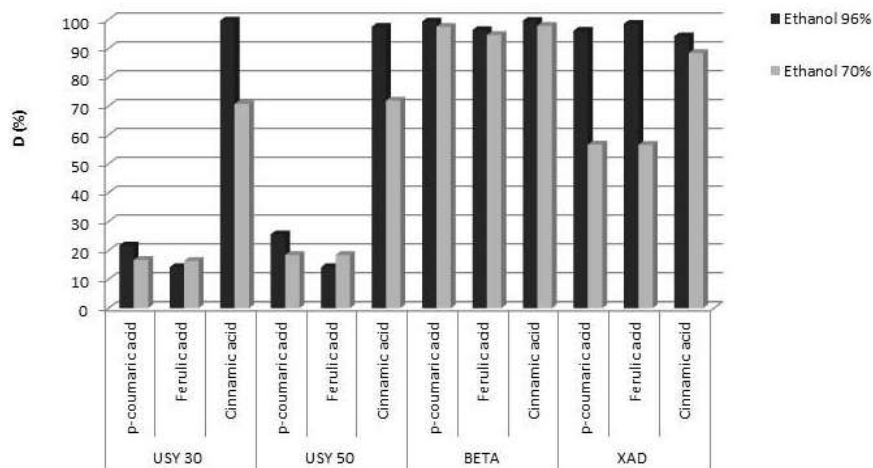


Fig. 6. Overall desorption ratios related to the three hydroxycinnamic compounds for the four studied adsorbents with ethanol 70% and ethanol 96%.

3.6. Regeneration of zeolites

Regeneration of adsorbents was tested for all adsorbents. A loss of efficiency of microporous solid to retain the hydroxycinnamic compounds was recorded in a second use of the adsorbent and whichever studied (Table 5). The most interesting BETA material lost about 20% of adsorption capacity of *p*-coumaric acid which was the most abundant investigated hydroxycinnamic acid in the hemp wood extract. This is certainly due to the remaining ethanol molecules inside the pores despite drying which are responsible for co-adsorption phenomena. On the other hand, it also affects in these conditions the adsorption kinetics which is slower in the second use. For example, for BETA zeolite, the equilibrium is reached only after 1.5 h. Additional tests show that adsorption capacity can be of the same order of magnitude for the second adsorption when BETA zeolite is beforehand dried at 200°C instead of 140°C. Regeneration conducted by washing with isopropyl alcohol like proposed by Thiel et al. [15] and dried at 200°C in this work leads to the same results. Thermal regeneration avoids to use solvent.

Table 4.

Comparison of adsorption rates of hydroxycinnamic acids (%) for synthetic solutions and plant extracts (contact time: 2 h).

		A (%) at t=2h		
		<i>p</i> -coumaric acid	Ferulic acid	Cinnamic acid
Hemp wood extract (MW) <small>(<i>p</i>-coumaric acid: ~ 20 mg L⁻¹ Ferulic acid: < LOQ Cinnamic acid: ~ 9 mg L⁻¹)</small>	USY30	68 ± 6	ND	81 ± 6
	USY50	39 ± 4	ND	76 ± 4
	BETA	94 ± 6	ND	93 ± 7
	XAD16	8 ± 3	ND	61 ± 4
Hemp wood extract (Ext)	USY30	63 ± 5	ND	ND

(<i>p</i> -coumaric acid: ~ 30 mg L ⁻¹ Ferulic acid: < LOQ Cinnamic acid: <LOQ)	BETA	92 ± 4	ND	ND
Synthetic solution at 200 mg L ⁻¹	USY30	51 ± 3	87± 4	81 ± 4
	USY50	40 ± 2	83 ± 4	77 ± 4
	BETA	94 ± 5	99 ± 5	96 ± 5
	XAD16	6 ± 1	24 ± 1	69 ± 3
Hemp wood extract (MW) spiked at around 200 mg L ⁻¹	USY30	59 ± 3	83± 4	75 ± 4
	USY50	36 ± 2	79 ± 4	70 ± 4
	BETA	93 ± 5	99 ± 5	96 ± 5
	XAD16	8 ± 1	20 ± 1	70 ± 3

ND: not determined because of concentrations less than limit of quantification (LOQ).

MW: microwave extraction, Ext: twin-screw extrusion.

Table 5.

Decrease of adsorption capacity for the second use (%) (contact time: 2 h, synthetic solution ($C_i = 200$ mg L⁻¹), $m_{\text{adsorbent}} = 50$ mg, $24 \pm 2^\circ\text{C}$, pH=3.5).

	<i>p</i> -coumaric acid	Ferulic acid	Cinnamic acid
USY30	13	14	27
USY50	10	11	27
XAD16	0	11	30
BETA (a)	21	23	13
BETA (b)	7	9	6

(a): according to §2.8., (b) : zeolites dried at 200°C before the second adsorption

4. Conclusion

USY and BETA zeolites (respectively FAU-type structure and *BEA-type structure) have more important adsorption capacities for hydroxycinnamic acids than XAD16 resin as well as faster adsorption kinetics. The adsorption capacity was dependent on pH and higher at pH less than pK_{a1}. Maximum adsorption capacities were calculated for the targeted compounds for pH=3.5 by using the Langmuir isotherm model. They reached higher values for zeolites than for XAD16 and are respectively of 139, 122 and 109 mg g⁻¹ for ferulic, *p*-coumaric and cinnamic acids for BETA zeolite. For the latter, desorption ratios of the three targeted compounds are close to 100 % with ethanol 96 %. The possible regeneration of this adsorbent constitutes a great asset for its implementation. It is the first use of these zeolites for plant extracts applications; they offer promising results with the highest adsorption ratios from vegetal extracts.

Acknowledgements

The authors thank INRA for the financing of the AIC project VALIGNOBIO and also Pr Corinne Dufaure (CIRIMAT) for her precious help in the use of Hyperchem software.

References

- [1] A.M. Boudet, Evolution and current status of research in phenolic compounds, *Phytochemistry* 68 (22-24) (2007) 2722-2735.
- [2] N. Kumar, V. Pruthi, Potential applications of ferulic acid from natural sources, *Biotechnology Reports* 4 (2014) 86-93.
- [3] A.T. Mbaveng, Q. Zhao, V. Kuete, 20-Harmful and Protective Effects of Phenolic Compounds from African Medicinal Plants, *Toxicological Survey of African Medicinal Plants* (2014) 577-609.
- [4] N. Balasundram, K. Sundram, S. Samman, Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chemistry* 99 (1) (2006) 191-203.
- [5] F. Ferri, L. Bertin, A. Scoma, L. Marchetti, F. Fava, Recovery of low molecular weight phenols through solid-phase extraction, *Chemical Engineering Journal* 166 (3) (2011) 994-1001.
- [6] M.L. Soto, A. Moure, H. Dominguez, J.C. Parajo, Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: A review, *Journal of Food Engineering* 105 (2011) 1-27.
- [7] F. An, R. Du, X. Wang, M. Wan, X. Dai, J. Gao, Adsorption of phenolic compounds from aqueous solution using salicylic acid type adsorbent, *Journal of Hazardous Materials* 201-202 (2012) 74-81.
- [8] F. Garavand, A. Madadlou, Recovery of phenolic compounds from effluents by a microemulsion liquid membrane (MLM) extractor, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 443 (2014) 303-310.
- [9] D. Wang, D. Li, Y. Liu, D. Lv, Y. Ye, S. Zhu, B. Zhang, Study of a new complex method for extraction of phenolic compounds from bio-oils, *Separation and Purification Technology* 134 (2014) 132-138.
- [10] J. Wiboonsirikul, S. Adachi, Extraction of functional substances from agricultural products or by products by subcritical water treatment, *Food Sci. Technol. Res.* 14 (2008) 319-328.
- [11] I. Ignat, I. Volf, V.I. Popa, A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables, *Food Chemistry* 126 (4) (2011) 1821-1835.
- [12] C. Celhay, C. Mathieu, L. Candy, G. Vilarem, L. Rigal, Aqueous extraction of polyphenols and antiradicals from wood by-products by a twin-screw extractor: Feasibility study, *Comptes Rendus Chimie* 17 (2014) 204-211.
- [13] Md. Ahmaruzzaman, Adsorption of phenolic compounds on low-cost adsorbents: a review, *Advances in Colloid and Interface Science* 143 (2008) 48-67.
- [14] R.I. Yousef, B. El-Eswed, A. Al-Muhtaseb, Adsorption characteristics of natural zeolites as solid adsorbents for phenol removal from aqueous solutions: Kinetics, mechanism, and thermodynamics studies, *Chemical Engineering Journal* 171 (3) (2011) 1143-1149.
- [15] A. Thiel, N. Tippkötter, U. Sohling, F. Ruf, R. Ulber, New zeolite adsorbents for downstream processing of polyphenols from renewable resources. *Engineering Life Sciences* 13 (2013) 239-246.
- [16] L. Estevinho, A.P. Pereira, L. Moreira, L.G. Dias, E. Pereira, Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey, *Food and Chemical Toxicology* 46 (12) (2008) 3774-3779.
- [17] O. Kenny, T.J. Smyth, C.M. Hewage, N.P. Brunton, Antioxidant properties and quantitative UPLC-MS analysis of phenolic compounds from extracts of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds and bitter melon (*Momordica charantia*) fruit, *Food Chemistry* 141 (4) (2013) 4295-4302.
- [18] D.R. Kammerer, J. Kammerer, R. Valet, R. Carle, Recovery of polyphenols from the by-products of plant food processing and

application as valuable food ingredients, Food Research International 65 (2014) 2-12.

[19] M.L. Soto, E. Conde, N Gonzalez-Lopez, M.J. Conde, A. Moure, J. Sineiro, E. Falqué, H. Dominguez, M.J. Nunez, Recovery and concentration of antioxidants from winery wastes, Molecules 17 (2012) 3008-3024.

[20] A. Scoma, C. Pintucci, L. Bertin, P. Carlozzi, F. Fava, Increasing the large scale feasibility of a solid phase extraction procedure for the recovery of natural antioxidants from olive mill wastewaters, Chemical Engineering Journal 198-199 (2012) 103-109.

[21] L. Bertin, F. Ferri, A. Scoma, L. Marchetti, F. Fava, Recovery of high added value natural polyphenols from actual olive mill wastewater through solid phase extraction, Chemical Engineering Journal 171 (2011) 1287-1293.

[22] Ch. Baerlocher, W.M. Meier, D.H. Olson, Atlas of zeolite framework types, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 2001.

[23] S. Bassil, L. Candy, V. Simon, C. Raynaud, Extraction of bioactive compounds using twin-screw extrusion: comparison between two hemp by-products. 10th international conference on renewable resources and biorefineries RRB-10, June 04-06 2014, Valladolid, Spain.

[24] S. Bassil, L. Candy, A. Thuret, A. Masseron, V. Simon, C. Raynaud, Valorisation de *Cannabis sativa* L. pour l'obtention de monomères aromatiques à haute valeur ajoutée. Séminaire INRA CEPIA BILI, 14-15 mai 2013, Paris, France.

[25] J. Tranchant, Manuel pratique de la chromatographie en phase gazeuse, Editions Masson, Paris, 1995.

[26] A.T. Mohd Din, B.H. Hameed, A.L. Ahmad, Batch adsorption of phenol onto physiochemical-activated coconut shell, Journal of Hazardous Materials 161 (2009) 1522-1529.

[27] D. Richard, M.L. Delgado Núñez, D. Schweich, Adsorption of complex phenolic compounds on active charcoal: Adsorption capacity and isotherm, Chemical Engineering Journal 148 (1) (2009) 1-7.

[28] K.E. Noll, V. Gounaris, W.-S. Hou, Adsorption technology for Air and Water Pollution Control, Lewis Publishers, Chelsea, MI, 1992.

[29] N.E. Dávila-Guzman, F.J. Cerino-Córdova, P.E. Diaz-Flores, J.R. Rangel-Mendez, M.N. Sánchez-González, E. Soto-Regalado, Equilibrium and kinetic studies of ferulic acid adsorption by Amberlite XAD-16, Chemical Engineering Journal 183 (2012) 112-116.

[30] T. Kuzniatsova, Y. Kim, K. Shqau, P.K. Dutta, H. Verweij, Zeta potential measurements of zeolite Y : Application in homogeneous deposition of particle coatings, Microporous and Mesoporous Materials 103 (2007) 102-107

[31] T.V. Kulik, N.A. Lipkovska, V.N. Barvinchenko, B.B. Palayanytsya, O.A. Kazakova, O.A. Dovbiy, V.K. Pogorelyi, Interactions between bioactive ferulic acid and fumed silica by UV-vis spectroscopy, FT-IR, TPD MS investigation and quantum chemical methods, Journal of Colloid and Interface Science 339 (2009) 60-68.

[32] P. Moreau, S. Colette-Maatouk, P. Gareil, P.E. Reiller, Modelling of the adsorption of phenolic acids onto α,γ -alumina particles, Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 435 (2013) 97-108.

[33] M. Sprynskyy, T. Ligor, M. Lebedynets, B. Buszewski, Kinetic and equilibrium studies of phenol adsorption by natural and modified forms of the clinoptilolite, Journal of Hazardous Materials 169 (2009) 847-854.

[34] W.-T. Tsai, K.-J. Hsien, H.-C. Hsu, Adsorption of organic compounds from aqueous solution onto the synthesized zeolite, Journal of Hazardous Materials 166 (2009) 635-641.

[35] J.C. del Río, A. Gutierrez, I.M. Rodriguez, D. Ibarra, A.T. Martinez, Composition of non-woody plant lignins and cinnamic acids by Py-GC/MS, Py/TMAH and FT-IR, J. Anal. Appl. Pyrolysis 79 (2007) 39-46.

IV. 3. Conclusion

Trois zéolithes de type FAU (USY30 et USY50) et *BEA (BETA) ont été étudiées en parallèle à la résine XAD16. Les résultats des études d'adsorption et de désorption mis en œuvre sur des solutions modèles ont montré que la zéolithe BETA est le plus pertinent des adsorbants étudiés avec non seulement des capacités d'adsorption plus élevées pour les molécules d'acide férulique, d'acide *p*-coumarique et d'acide cinnamique, mais également des taux de désorption en présence d'éthanol 70 % et d'éthanol 96 %, proches de 100 %. Des tests complémentaires réalisés sur des extraits de chènevotte obtenus par extraction micro-ondes et par extrusion bi-vis ont abouti à des conclusions similaires. La régénération de la zéolithe est envisageable par thermodésorption. Ces différents points montrent le potentiel important présenté par cet adsorbant pour l'enrichissement de ce type d'extrait.

Conclusion générale et perspectives

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre des recherches du Laboratoire de Chimie Agroindustrielle portant sur la « Valorisation Non Alimentaire des Agroressources » dans le but de trouver de nouveaux débouchés pour les produits et co-produits de l'agriculture et de la forêt actuellement peu ou pas valorisés. Il est ciblé sur la filière chanvre qui est en plein essor pour la production de fibres. Le procédé de défibrage génère 30% de fibres pour 70% de co-produits lignocellulosiques : chènevotte (50%) et poudre organique (20%). Ces derniers sont des sources naturelles potentielles de molécules à haute valeur ajoutée et en particulier d'acides hydroxycinnamiques tels que les acides férulique et coumarique. Toutefois, la répartition et le mode de liaison de ces molécules au sein de la structure de *Cannabis sativa* n'a pas fait à ce jour l'objet de travaux scientifiques.

De plus, même si ces molécules sont naturellement présentes dans toute matière végétale lignocellulosique, les méthodes d'extraction étudiées jusqu'alors restent à l'état exploratoire et à l'échelle analytique. Aucune étude n'avait été menée jusqu'à présent pour extraire ces molécules d'intérêts des co-produits du chanvre. Dans ce contexte, nous avons, au cours de ce travail de thèse, tenté de répondre aux trois questions majeures suivantes :

Quelle est la répartition intrinsèque des acides hydroxycinnamiques dans la chènevotte et la poudre organique ?

Quel procédé d'extraction efficace des acides hydroxycinnamiques est-il possible de mettre en œuvre pour chacun des coproduits ?

Les zéolithes sont-elles performantes pour l'enrichissement des extraits ?

Notre approche globale de caractérisation morphologique, physique et chimique a permis entre autres de qualifier plus précisément les fractions pariétales de la structure lignocellulosique et les constituants non fibreux. La répartition fibres/non fibres diffère pour ces deux coproduits : 87/13 pour la chènevotte et 62/38 pour la poudre organique avec des teneurs en lignine respectives de 18 %/MS et 7 %/MS. Les deux coproduits apparaissent ainsi être de bons candidats pour la valorisation des composés phénoliques dont les rendements d'extraction maximaux obtenus ont été évalués, dans le cadre de ces travaux, entre 13 et 17 mg d'EAG/g MO_i. Une hydrolyse séquencée a permis de montrer que la majorité de l'acide férulique est étherifié pour les deux matières alors que l'acide *p*-coumarique est majoritairement estérifié dans la poudre organique et lié en proportions équivalentes par des liaisons ester et éther dans la chènevotte.

Résultats de l'analyse quantitative et répartition des acides férulique et coumarique dans la structure lignocellulosique des co-produits du chanvre

Chènevotte								
	Total		Libre		Ester		Ether	
	(%)	(µg/g MO _i)	(%)	(µg/g MO _i)	(%)	(µg/g MO _i)	(%)	(µg/g MO _i)
AF	100	300	9	26	2	6	89	268
ApC	100	3540	14	507	46	1613	40	1420
Ratio ApC/AF	/	12	/	20	/	269	/	5
Poudre organique								
	Total		Libre		Ester		Ether	
	(%)	(µg/g MO _i)	(%)	(µg/g MO _i)	(%)	(µg/g MO _i)	(%)	(µg/g MO _i)
AF		160	13	21	24	38	63	101
ApC		1000	20	202	70	700	10	98
Ratio ApC/AF	/	6	/	7	/	24	/	1

La recherche de nouvelles voies de valorisation chimique des résidus de transformation du chanvre doit faire l'objet d'une meilleure connaissance de la maîtrise des procédés d'extraction. Les travaux de thèse ont permis de valider l'extraction assistée par micro-ondes et l'extraction thermo-mécano-chimique, toutes deux permettant d'intensifier l'extraction des acides férulique et *p*-coumarique dans des conditions respectueuses de l'environnement. Pour les deux méthodes d'extraction, ce travail a montré que le solvant hydro-alcoolique alcalin conduisait aux rendements optimaux :

- en ApC par MAE et en AF par extrusion bi-vis pour la chènevotte.
- en acides hydroxycinnamiques par extrusion bi-vis pour la poudre organique

Pour une extraction thermo-mécano-chimique en extrudeur bi-vis, le solvant hydro-alcoolique alcalin permet d'atteindre les rendements maximaux :

- de 33 % du potentiel en acide férulique et 51 % du potentiel en acide *p*-coumarique dans le cas de la chènevotte.
- de 59 % du potentiel en acide férulique et de dépasser de 13% le potentiel en acide *p*-coumarique dans le cas de la poudre organique

Finalement, après déstructuration réactive de la matière première et séparation liquide/solide dans l'extrudeur, il s'avère qu'une grande partie des molécules libérées reste retenue dans l'extrudât. Elles ont été évaluées par extractions analytiques. En les cumulant aux valeurs issues de l'extraction bi-vis, les potentiels en ApC sont dépassés alors que les quantités d'AF restent faibles. Par rapport à la seule étape d'extraction bi-vis, les rendements en ApC sont plus que doublés pour les deux matières lorsque l'extrudât est valorisé. Ainsi, l'extraction alcaline en

extrudeur bi-vis, conduit à l'hydrolyse préférentielle des liaisons ester et à l'hydrolyse partielle des liaisons éther dont la rupture totale nécessiterait des conditions chimiques et/ou thermiques plus dures.

Comparaison des quantités d'acides hydroxycinnamiques extraites ($\mu\text{g/g MO}_i$) des co-produits du chanvre par différents procédés

	Chènevotte			Poudre organique		
	Potentiel	Extrusion bi-vis	Extraction multiétiquée	Potentiel	Extrusion bi-vis	Extraction multiétiquée
Acide férulique	300	100	120	160	95	110
Acide <i>p</i> -coumarique	3540	1810	4200	1000	1150	2200
Ratio <i>ApC/AF</i>	12	18	35	6	12	19

Les données acquises permettent d'envisager un transfert à l'échelle industrielle pour donner lieu à de nouveaux débouchés aux filières traditionnelles.

L'enrichissement des extraits a été envisagé par l'étude de trois zéolithes de type FAU (USY30 et USY50) et *BEA (BETA) en parallèle à la résine XAD16. Les études d'adsorption et de désorption sur des solutions modèles ont montré que la zéolithe BETA était la plus pertinente avec non seulement des capacités d'adsorption plus élevées pour les molécules d'acide férulique et d'acide *p*-coumarique, mais également des taux de désorption en présence d'éthanol proches de 100 %. Les tests réalisés sur des extraits bi-vis et MAE de chènevotte ont abouti à des conclusions similaires. La régénération de la zéolithe est envisageable par thermodésorption. Ces travaux de thèse ont permis de montrer le potentiel important que peut représenter cet adsorbant pour l'enrichissement de ce type d'extrait et ont fait l'objet d'une publication dans la revue internationale Chemical Engineering Journal.

A la lumière de ces résultats et dans la continuité des travaux déjà réalisés, plusieurs axes peuvent être envisagés pour la poursuite des recherches sur la valorisation chimique des co-produits de la filière chanvre. Ils peuvent être déclinés sous deux angles complémentaires : la poursuite de l'acquisition de connaissances fondamentales sur les structures des deux matières premières et une investigation sur l'optimisation des procédés intensifiés étudiés pour l'extraction des acides hydroxycinnamiques.

En premier lieu, sachant qu'en plus des acides hydroxycinnamiques, molécules cibles de notre étude, d'autres composés phénoliques ont été détectés dans les extraits, une identification plus exhaustive de ces derniers doit être envisagée. Ces composés phénoliques, simples ou plus

complexes, comme par exemple des monomères ou oligomères hydrolysés à partir des composants de la structure lignocellulosique, représentent un mélange complexe de composés à analyser. Ainsi, pour mener à bien cet objectif d'identification moléculaire, de nouvelles méthodes d'échantillonnage et d'analyse devront être développées sur les extraits natifs.

Il a été clairement démontré que les acides hydroxycinnamiques présentent un intérêt majeur dans de nombreuses applications de pointe. Or, nous avons pu constater qu'aucun protocole analytique normé n'existait actuellement pour la détermination des potentiels en acides hydroxycinnamiques de la matière végétale. Que ce soit pour la détermination des formes libres ou liées sous formes estérifiées ou étherifiées, la discussion sur les conditions opératoires reste très ouverte et les valeurs mesurées pour une même matière végétale peuvent être très variables, non seulement à cause de la matière en elle-même (origine géographique, lot, hétérogénéité...) mais surtout du protocole mis en œuvre. Proposer un protocole standard serait ainsi un grand pas vers la mise en place d'une base de données sur les teneurs en acides hydroxycinnamiques des matières végétales pour ainsi pouvoir positionner les co-produits du chanvre dans un panel de matières premières identifiées.

Sur le plan des procédés, produire des extraits enrichis en acides hydroxycinnamiques peut être envisagé sous plusieurs angles complémentaires.

Tout d'abord, il a été démontré, lors des essais de faisabilité, que les deux procédés intensifiés que sont l'extraction assistée par micro-ondes et surtout l'extraction par extrusion bi-vis sont pertinents pour l'objectif poursuivi. Néanmoins, l'optimisation des conditions d'extraction pourrait conduire à des rendements en acides phénoliques maximisés. Un préfractionnement mécanique permettrait d'obtenir des fractions déjà plus riches en lignine. Pour l'extraction MAE avec un solvant hydro-alcoolique, des études cinétiques à différentes teneurs en réactif alcalin seraient un moyen rapide de conclure sur le potentiel de cette technologie.

Pour l'extraction en extrudeur bi-vis, le développement d'un procédé optimal passe par la mise en place d'une extraction multi-étagée en conditions alcalines hydro-alcooliques. Dans cet objectif, de nombreux paramètres opératoires devront être étudiés pour parvenir à des extraits compétitifs. Une fois ces derniers acquis, un transfert d'échelle sur des extrudeurs de capacité supérieure sera l'échelon final du développement de ce procédé d'extraction.

Quel que soit le procédé retenu, les extraits pourront être valorisés directement ou être enrichis en molécules cibles. Nous avons pu démontrer que les zéolithes étaient particulièrement adaptées pour remplir cette mission. Néanmoins, nous avons focalisé notre étude sur deux types de zéolithes (FAU et *BEA) et il peut être envisagé d'en élargir le spectre. Il faudrait étudier plus

particulièrement leur sélectivité vis-à-vis des différentes molécules contenues dans les extraits en vue de leur purification.

Enfin, la valorisation des résidus solides de l'extraction devra faire partie intégrante du schéma de fractionnement final des co-produits du chanvre. Développer des alternatives pour la valorisation des extrudats permettra, entre autres, de minimiser l'impact environnemental du procédé. Ces produits pourraient être, par exemple, valorisés dans l'industrie des agro-matériaux ou de l'énergie en tant que combustibles, ou alors revenir au sol pour les cultures.

Une fois le procédé global d'extraction défini, il sera nécessaire d'étudier son dimensionnement et d'effectuer un bilan économique et environnemental. Ce dernier point permettra d'apporter un élément de réponse à la question suivante : est-ce que les conditions optimales et le coût qu'elles génèrent sont en adéquation avec le passage à l'échelle pilote et avec le prix de vente des différents produits issus du fractionnement de la chènevotte et de la poudre organique ?

Matériel et méthodes

Table des matières

1.	Origine, conditionnement et caractérisation des coproduits du chanvre	273
1.1.	Origine des matières premières.....	273
1.2.	Prétraitement de la matière première	273
	Les matières premières utilisées dans cette étude n'ont subi aucune étape de séchage.....	273
1.3.	Caractérisation physique de la matière première	274
a.	Observation sous loupe binoculaire	274
b.	Caractérisations des parois végétales par des approches en microscopie	274
c.	Distribution granulométrique.....	276
d.	Densité tapée	276
1.4.	Caractérisation chimique de la matière première.....	277
a.	Détermination des matières sèches, minérales et organiques	277
b.	Dosage des minéraux	278
c.	Détermination de la proportion en constituants pariétaux : cellulose, hémicelluloses et lignine.....	279
d.	Dosage des protéines.....	281
e.	Dosage des pectines	282
f.	Dosage des lipides.....	283
1.5.	Détermination du potentiel en composés extractibles	284
1.6.	Extraction séquencée : caractérisation des liaisons éther et ester dans les coproduits du chanvre.....	285
a.	Etape I : Décirage et extraction des composés phénoliques libres	287
b.	Etape II : Acide férulique et acide p-coumarique estérifiés et les phénols associés (hydrolyse alcaline).....	287
c.	Etape III : Acide férulique et acide p-coumarique étherifiés (hydrolyse acide)	288
2.	Fractionnement des coproduits du chanvre.....	289
2.1.	Macération ou extraction en batch.....	289
2.2.	Extractions Soxhlet	290
2.3.	Extraction accélérée par solvant ASE.....	290
a.	Essais préliminaires	291

b.	Préparation des échantillons	292
c.	Fonctionnement de l'ASE	292
2.4.	Hydrolyse alcaline en batch	294
a.	Etude préliminaire.....	294
b.	Protocole expérimental retenu	296
2.5.	Extraction en extrudeur bi-vis BC21	296
a.	Présentation de l'extrudeur BC21	296
b.	Equipements périphériques	297
c.	Configuration du profil de vis.....	297
d.	Post traitement des filtrats.....	299
e.	Post traitement des extrudats	300
2.6.	Extraction assistée par micro-ondes.....	300
a.	Remarques sur la faisabilité de l'extraction liquide/solide en réacteurs micro-ondes..	300
b.	Conditions opératoires d'extraction en réacteur micro-ondes	301
c.	Post-traitement des échantillons	302
3.	Méthodes d'analyse	302
3.1.	Dosage des polyphénols totaux contenus dans un extrait.....	302
3.2.	Dosage des acides phénoliques par chromatographie en phase liquide à haute performance	304
4.	Concentration des extraits.....	308
a.	Préparation des adsorbants.....	309
b.	Etape d'adsorption	309
c.	Etape de désorption.....	309
d.	Etape de régénération.....	309
5.	Références bibliographiques.....	310

1. Origine, conditionnement et caractérisation des coproduits du chanvre

1.1. Origine des matières premières

Pour cette étude, les coproduits de chanvre ont été fournis par la société « AGROFIBRE SAS », située dans le Sud-Ouest de la France et appartenant au groupe coopératif agricole Euralis. Cette usine agro-industrielle dédiée à la première transformation du chanvre industriel a fermé ses portes, au cours de la thèse, en Juin 2014.

La chènevotte a été fourni sous forme de lots de « granulats isolant en chanvre » de 20 kg. Les granulats ont une longueur de 5 à 30 mm et une épaisseur de 1 à 3 mm, une densité $\rho = 90-115$ kg/m³ et une conductivité thermique $\lambda = 0,05$ W.m.K. Chaque lot de 20 kg a une capacité d'absorption de 200 L.

Un deuxième lot de chènevotte ou lot N°1 a été cité au cours de cette étude. Ce lot a servi pour des études antérieures au sein du laboratoire et a été utilisé pour des essais préliminaires.

La poudre organique utilisée dans cette étude est disponible sous forme de lots de « litière en chanvre » de 20 kg chacun et de capacité d'absorption de 800 L/lot.

1.2. Prétraitement de la matière première

Les matières premières utilisées dans cette étude n'ont subi aucune étape de séchage.

Selon les expériences envisagées, elles ont été broyées au moyen d'un broyeur à couteaux Pulverisette FRITSCH BRO 181 équipé d'une grille d'exclusion de taille variable (0,5 à 6 mm).

La taille d'exclusion des grilles a été choisie en fonction des expériences :

- Pour l'ensemble des essais du Chapitre II : broyage avec une grille de 0,5 mm.
- Pour les essais d'extraction MAE : broyage à 0,5 mm.
- Pour les essais préliminaires, la chènevotte (lot N°1) a été broyée avec une grille de 2 mm.
- Pour l'extrusion bi-vis, aucun broyage n'a été réalisé.



Figure 1 : Broyeur à couteaux Pulverisette FRITSCH BRO 181

La matière végétale broyée ou non a été conservée dans des sacs étanches à température ambiante.

1.3. Caractérisation physique de la matière première

a. Observation sous loupe binoculaire

Les échantillons solides ont été observés à leur humidité d'équilibre à l'aide d'une loupe binoculaire Nikon SMZ 1500. Celle-ci est équipée de la caméra numérique Nikon DS FI2, elle-même reliée à un ordinateur. Le logiciel NIS Elément BR (version 4.13.04) permet la récupération des clichés.

Le diamètre et la longueur des particules dans les échantillons solides ont été évalués à l'aide du logiciel d'analyse d'image (ImageJ). Le facteur de forme est calculé à partir du rapport longueur/diamètre.

b. Caractérisations des parois végétales par des approches en microscopie

Mise en évidence des composés lignifiés :

- Réaction de Wiesner (Coloration au Phloroglucinol-HCl).

La réaction de Wiesner est réalisée sur des coupes de matériel en l'état et les observations sont faites en fond clair. La coloration a été réalisée avec du phloroglucinol en solution chlorhydrique selon la norme NF Q 03-001 (Prolabo 26.337.180). Les coupes ont été réalisées à main levée et immergées dans la solution de phloroglucinol. La réaction est immédiate. Les coupes sont montées entre lame et lamelle et observées de façon extemporanée en lumière blanche.

Cette réaction est particulièrement simple et conduit au développement d'une coloration rose rouge des parois lignifiées. Elle permet de bien visualiser les parois des tissus lignifiés et de comparer des tissus selon leur teneur en lignine. Elle ne permet pas de distinguer la nature des sous-unités composant les lignines (Chaffey 2002).

- Réaction de Maïle.

L'objectif de cette réaction est de mettre en évidence les sous-unités S (Syringyl) et G (Guaiacyl) composant les lignines. Comme la réaction précédente, elle est réalisée sur des

coupes de matériel et les observations sont faites en fond clair. Cette réaction comprend différentes étapes :

- 1- Traitement (5-10 min) des coupes à température ambiante dans une solution aqueuse de permanganate de potassium (1%, w/v). La solution de KMnO_4 est instable et doit donc être fraîchement préparée.
- 2- Les coupes sont rincées abondamment dans de l'eau distillée (au moins 5 min).
- 3- Traitement de décoloration des coupes dans HCl 6N (température ambiante, pendant 1-5 min).
- 4- Rinçage 10 min dans l'eau distillée.
- 5- Révélation (formation d'un complexe coloré) et montage dans une solution aqueuse de NaHCO_3 (5%, w/v).

Une réaction conduit à la formation de complexes colorés rouge et/ou brun selon la nature prédominante de sous-unités composants les lignines. Les unités S (Syringyl) sont fortement colorées en rouge et les sous-unités G (Guaiacyl) en brun (Jensen 1962 ; Locquin et Langeron 1978 ; Chaffey 2002)

Cette appréciation qualitative des couleurs peut être remplacée par une détermination dans le système HSI (*Hue, Saturation, Intensity*) de la position précise de H (Hue = tonalité) sur le polygone des couleurs (valeur exprimée en degrés). Les images acquises étant codées dans le système RGB, la valeur de Hue est calculée selon la formule :

$$\text{Hue} = \cos^{-1} \left\{ \frac{(R-G) + (R-B)}{2 \sqrt{(R-G)^2 + (R-B)(G-B)}} \right\}$$

La distribution du nombre de pixels échantillonnés dans les parois soit des cellules du xylème, soit des vaisseaux en fonction du paramètre Hue, permet de discriminer sans difficulté les deux types de paroi en fonction de leur teneur relative en sous-unités S ou G (la couleur rouge étant centrée sur la position 0/360 du polygone des couleurs en HSI). Ainsi la valeur (au pic) de H des cellules du bois (parenchyme et fibres, cellules des rayons ligneux) est centrée sur la valeur de 360, alors que celle des parois des vaisseaux est centrée une valeur de 25-28 (Figure 2).

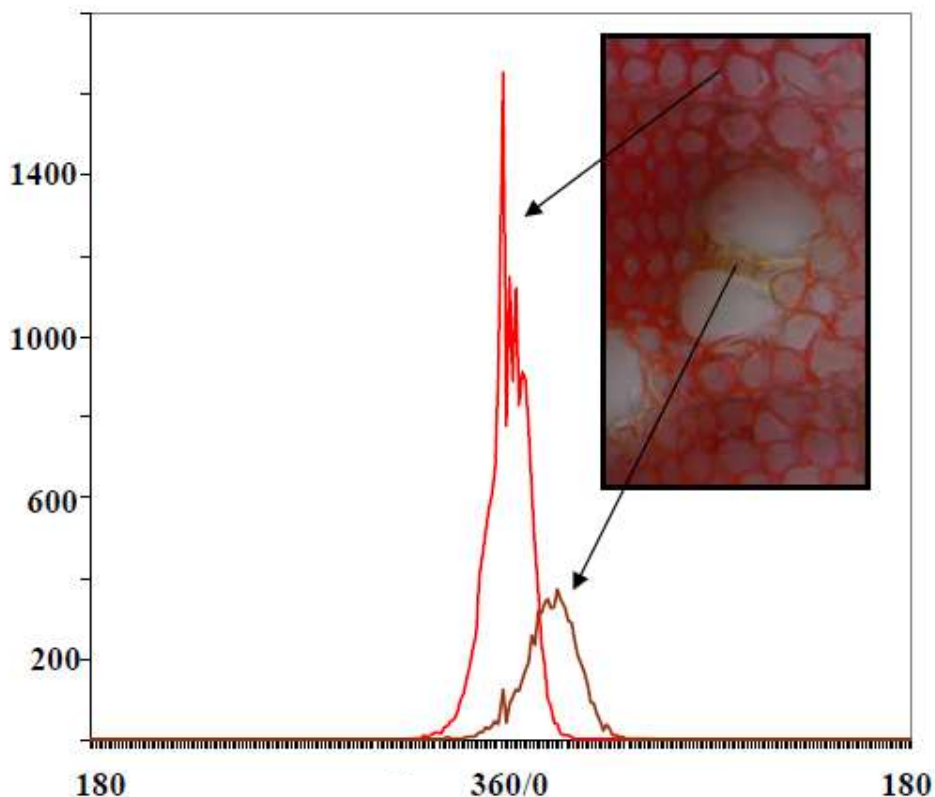


Figure 2 : Analyse des couleurs dans le système HSI sur des coupes de chènevotte après la réaction de Maïle. Le rouge est centré sur la valeur de 360/0 sur le polygone des couleurs et le brun présente une valeur centrée sur 25-28

c. Distribution granulométrique

La répartition granulométrique des particules est évaluée sur un tamis vibrant AS200 Basic de la société Retsch à l'aide de tamis métalliques Prüfsieb normalisés (ASTM). Les échantillons de 100 g sont tamisés 10 minutes à 60 % de l'intensité maximale de vibration du tamis. A la fin de l'opération, la fraction de produit qui se trouve sur chaque tamis est pesée.

d. Densité tapée

La densité tapée des poudres solides est déterminée à l'aide de l'appareil Granuloshop Densitap ETD-20. Celui-ci permet de compacter de façon reproductible les poudres dans une éprouvette. L'échantillon est d'abord pesé puis tassé (4 cycles de 1000 coups, à une vitesse de 250 coups/minute pour chaque cycle). Le volume occupé après tassement est lu à l'aide de la graduation de l'éprouvette. La densité tapée de l'échantillon est ainsi calculée.

1.4. Caractérisation chimique de la matière première

a. Détermination des matières sèches, minérales et organiques

Les matières sèches ont été déterminées pour les matières premières ainsi que sur les solides et les extraits liquides issus de la caractérisation, de l'extraction et du fractionnement de ces coproduits.

Matière sèche

Une masse (m_i) de l'échantillon (1-5 g pour les solides et 5-20 g pour les liquides) a été introduite dans un creuset en porcelaine préalablement séché et taré (tare m_0), pesée puis placée dans une étuve ventilée à $103 \pm 2^\circ\text{C}$ jusqu'à poids constant (selon la norme NF V 03-903). L'ensemble (creuset contenant la matière sèche) a été pesé (m_{f1}) après refroidissement dans un dessiccateur contenant du gel de silice. La teneur en matière sèche (MS) est exprimée en pourcentage en masse et est égale à :

$$\%MS = 100 \cdot (m_{f1} - m_0) / m_i$$

Matière minérale

La teneur en matières minérales (ou cendres minérales) (%MM) a été déterminée par calcination des échantillons secs (préparés selon le protocole ci-dessus) dans un four à 550°C pendant 6 heures (selon la norme NF V 03-322). Après refroidissement dans un dessiccateur, les creusets ont été pesés à nouveau (m_{f2}). Le résidu calciné obtenu est une poudre grise, claire et légère. La teneur en matières minérales est exprimée en pourcentage en masse et est égale à :

$$\%MM = 100 \cdot (m_{f2} - m_0) / (m_{f1} - m_0)$$

Matière organique

La différence pondérale entre la masse de matière sèche et la masse de matière minérale correspond à la masse de matière organique (MO). Exprimée en pourcentage massique, elle est égale à :

$$\%MO = \%MS - \%MM$$

Exprimée en unité massique, elle est égale à :

$$MO_{(g)} = MS_{(g)} * (100 - \%MM) / 100$$

b. Dosage des minéraux

Le calcium, le magnésium, le sodium et le potassium ont été dosés par spectrophotométrie d'absorption atomique et le phosphore par colorimétrie. Ces analyses ont été réalisées par le service alimentation de l'UMR 1289 INRA-INP/ENSAT-ENVIT « TANDEM », Toulouse. Une seule analyse a été réalisée pour chaque échantillon.

Les normes ou directives appliquées pour les dosages des minéraux sont les suivantes :

- Dosage du magnésium dans les aliments par Spectrophotométrie d'Absorption Atomique (SAA) : 4ème Directive 73/46/CEE du 5 décembre 1972.
- Dosage du Calcium par SAA : Norme NF-V-18-108-Sept 1984.
- Dosage du Phosphore Total par Colorimétrie : Norme NF-V-18-106-juin 1980 (Minéralisation voie sèche)
- Dosage des Sodium et potassium par SAA : 1ère directive 71/250/CEE du 5 juin 1971.

Les limites de quantification sont représentées, comme indiqué dans les normes, par des gammes d'analyses réalisées à partir d'échantillons d'aliments d'animaux et des fourrages qui contiennent tous les éléments recherchés. Les valeurs de mesures inférieures à la valeur du premier point de gamme sont considérées comme non quantifiables. Les gammes sont les suivantes et sont exprimées en mg/L : Ca : 1 à 10 ; Mg : 0,25 à 1,00 ; Na/K : 0,1 à 1,0 ; P : 5 à 40.

Les limites de détection sont remplacées par les concentrations caractéristiques spécifiques à la SAA. Ce sont les concentrations pour lesquelles on observe une absorbance de 0,0044 (soit 1% d'absorption de la radiation transmise). Cela n'est pas applicable au P qui est mesuré par colorimétrie.

Les valeurs des concentrations caractéristiques sont les suivantes : Ca : 0,06 mg/L, Na et K : 0,01 mg/L, Mg : 0,003 mg/L.

c. Détermination de la proportion en constituants pariétaux : cellulose, hémicelluloses et lignine

La méthode de *Van Soest and Wine* (Van Soest and Wine 1967) aussi appelée méthode ADF-NDF a été utilisée pour déterminer les teneurs en cellulose, hémicelluloses et lignine. Elle consiste à attaquer successivement la matière végétale avec deux détergents anioniques et cationiques, puis avec du permanganate de potassium en milieu tamponné.

Les réactions d'attaque de la matière végétale (0,8 à 1,0 g) sont effectuées dans des frittés spéciaux qui s'adaptent sur un système Tecator Fibertec M1017 (Foss). Ce dernier est équipé d'un dispositif de chauffage et de reflux permettant de faire l'ensemble des manipulations sans avoir à transvaser l'échantillon.

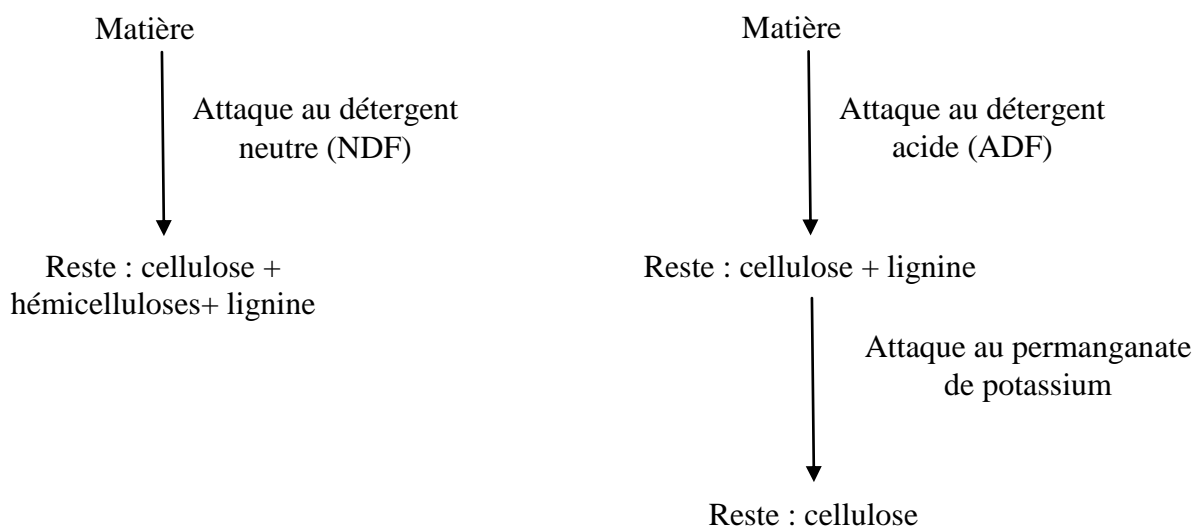


Figure 3 : Schéma représentant les différentes réactions d'attaque lors du dosage ADF-NDF

L'attaque NDF a été réalisée par ajout à l'échantillon à analyser de 100 mL de la solution NDF. Après une heure à ébullition, le mélange de réactifs a été éliminé par aspiration et le résidu a été rincé à l'eau bouillante jusqu'à disparition de la mousse. Le résidu a été ensuite séché à l'étuve à 103°C pendant douze heures et calciné dans un four à 550 °C pendant 3 heures. La pesée du fritté après séchage et calcination permet la détermination de la teneur globale en constituants pariétaux (cellulose + hémicelluloses + lignine).

Le réactif NDF est composé de : 30,00 g de laurylsulfate de sodium + 18,61 g d'éthylène diamine tétra-acétate de sodium (EDTA) + 4,56 g de phosphate disodique + 6,81 g de borate de sodium décahydraté. Ces composés sont dissous dans l'eau déminéralisée dans une fiole jaugée de 1 L.

L'attaque ADF a été réalisée sur le même appareil. Elle a été effectuée par ajout à l'échantillon à analyser de 100 mL d'un réactif ADF. Après une heure à ébullition, ce dernier est éliminé par aspiration (c'est-à-dire filtration des frittés sous vide) et le résidu est abondamment rincé à l'eau bouillante jusqu'à disparition de la mousse. Il est ensuite séché à l'étuve à 105 °C pendant 14 h avant de subir la seconde attaque permettant l'élimination de la lignine c'est-à-dire l'attaque ADF à froid ou aussi nommée attaque au permanganate de potassium.

Le réactif ADF est composé de : 20 g de cetyl triméthyl ammonium bromure (CTAB) + 26,8 mL d'acide sulfurique concentré. L'ensemble est complété à 1 L par ajout d'eau déminéralisée.

L'attaque au permanganate de potassium a été réalisée à l'aide de l'unité d'extraction à froid de l'appareil, par ajout au résidu de 25 mL d'un mélange d'une solution saturée de permanganate de potassium et d'une solution tampon (2:1 v/v) (solution mixte). Après 90 minutes de mise en contact et d'agitation régulière, les réactifs sont éliminés par aspiration et le résidu est rincé à l'aide d'une solution déminéralisante jusqu'à l'obtention de fibres de couleur blanche (rinçage pendant 30 minutes au maximum).

Deux lavages à l'éthanol 80 % ont été ensuite effectués avant le séchage du résidu cellulosique à l'étuve à 105°C pendant 12 heures puis sa calcination dans un four à 550°C pendant 3 heures. La pesée du fritté après chaque séchage et calcination permet la détermination des teneurs en lignines et cellulose

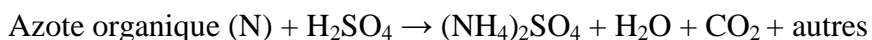
La composition des réactifs utilisés lors de cette attaque est la suivante :

- **Solution mixte** : 2 volumes de solution de KMnO_4 saturée (50 g/L) + 1 volume de solution tampon. La solution tampon est composée de : 6 g de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ + 0,15 g de AgNO_3 + 100 mL d'eau déminéralisée + 500 mL d'acide acétique glacial + 5 g d'acétate de potassium + 400 mL d'alcool butylique tertiaire.
- **Solution déminéralisante** : elle est composée de 50 g d'acide oxalique dihydraté, 700 mL d'éthanol à 95 %, 50 mL d'acide chlorhydrique 12 N, 250 mL d'eau déminéralisée.

d. Dosage des protéines

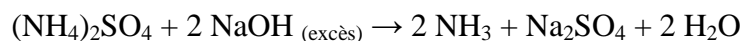
La détermination de la teneur en protéines a été réalisée par la méthode Kjeldhal selon la norme NF V 18-100. La méthode comporte deux étapes : (1) la transformation de l'azote organique contenu dans l'échantillon en azote minéral, (2) la titration de l'ammoniaque ainsi formé par un dosage acido-basique.

La transformation par minéralisation en milieu acide des protéines et de l'azote contenus dans l'échantillon conduit à la formation de sulfate d'ammonium.



Le protocole est le suivant : 0,5 à 1,5 g d'échantillon sont pesés dans les tubes d'analyse dans lesquels sont introduits 12,5 mL d'acide sulfurique concentré à 95 % et deux pastilles de catalyseur (CuSO_4). La réaction se produit pendant 2 h à une température consigne de 400 °C. (Tecator Kjelttec 2000 (Foss)).

La minéralisation est suivie d'une distillation. Lors de la distillation l'ammoniaque formée (NH_4^+) est convertie en NH_3 par action de la soude (la solution de soude utilisée est à 40 %)

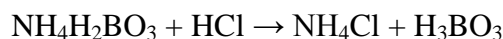


L'appareil Tecator Kjelttec 2200 (Foss) est utilisé. 80 mL d'eau distillée sont ajoutés à 50 mL de NaOH à 40 % dans le tube de minéralisation contenant l'échantillon minéralisé. La distillation du contenu du tube permet d'entraîner à la vapeur, de façon automatique, l'ammoniac produit par l'ajout de la soude. L'ammoniac est piégé dans l'erlenmeyer contenant 30 mL d'acide borique à 4 %, du vert de bromocrésol et du rouge de méthyle par barbotage de la vapeur dans la solution aqueuse d'acide borique coloré. L'indicateur coloré, rouge intense, vire au vert en présence d'un composé alcalin tel que l'ammoniac.

Complexe borate
d'ammonium (vert)



Afin de déterminer la teneur en azote total de la matière organique, l'ammoniac est ensuite titré par une solution d'acide chlorhydrique de 0,05 M ou 0,1 M, selon la teneur estimée dans l'échantillon, et la précision de la mesure désirée. La couleur de l'indicateur vire alors du vert au rose. La quantité d'acide chlorhydrique est directement proportionnelle à la quantité d'azote présente dans le milieu initial.



La teneur en azote total est alors calculée comme suit :

$$\%N = \frac{100 \times (V - V') \times N \times M}{MS}$$

- Où :
- V : volume d'acide utilisée pour la titration de l'échantillon (L),
 - V' : volume d'acide utilisé pour la titration du blanc (L),
 - N : normalité de l'acide chlorhydrique (mol/L),
 - M : masse molaire de l'azote (14,007 g/mol),
 - MS : masse sèche de l'échantillon (g).
- La teneur en protéines (P%) est obtenue en multipliant le pourcentage d'azote total par un coefficient de conversion (k), donné par le rapport entre la masse molaire moyenne des protéines et celle de l'azote. Dans notre cas, la teneur en protéines, exprimée en pourcentage en masse, est calculée ainsi :

$$\%P = \%N * k$$

avec k= 6,25 (selon AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) 1990)

e. Dosage des pectines

Les pectines sont mesurées selon une adaptation de la norme NF V05-128 (détermination des substances pectiques/Fruits, légumes et produits dérivés) qui consiste à extraire les pectines par de l'acide chlorhydrique 0,05 N après plusieurs lavages à l'éthanol. La teneur en pectines extraites est ensuite déterminée selon la méthode de Blumenkrantz et Asboe-Hansen (1973) qui

consiste en l'hydrolyse des pectines en milieu acide sulfurique concentré, libérant les acides galacturoniques qui sont dégradés en acides 5-formyl furoïques. Ces derniers, par condensation avec le réactif de m-hydroxydiphényl, forment un complexe chromophore de couleur rose dosé par spectrophotométrie UV-visible à 520 nm. L'étalonnage est réalisé à partir d'une solution d'acide galacturonique. Le résultat est exprimé en pourcentage d'acide galacturonique par rapport à la matière sèche.

Le protocole est le suivant :

Dans des tubes de volume proche de 10 mL, 3,0 mL d'une solution de tétraborate de sodium de 0,0125 M (préparée dans l'acide sulfurique concentré) ont été ajoutés à 0,5 mL de la solution à analyser (échantillon, étalon ou eau déminéralisée pour le blanc). Les tubes sont ensuite bouchés et introduits pendant 15 minutes dans un bain-marie à 100 °C puis refroidis dans un bain de glace. Pour les analyser, les étapes suivantes sont suivies pour chacun des tubes :

- Ajout de 50 µL d'une solution à 0,15 % (m/v) de m-hydroxydiphényl dans la soude à 0,5 % (réactif).
- Homogénéisation à l'aide d'un vortex.
- Mesure de l'absorption par spectroscopie UV à 520 nm et pendant 6 minutes.

La valeur d'absorption retenue est la valeur maximale atteinte durant la cinétique.

Les teneurs en acide galacturonique sont ensuite calculées suivant la loi de Beer-Lambert.

f. Dosage des lipides

La teneur en lipides des coproduits du chanvre a été déterminée selon la norme NF EN ISO 659.

Les lipides correspondent à la fraction extractible au cyclohexane et ont été obtenus par une extraction Soxhlet de 6 h d'une quantité de 10 g de matière par 200 mL de solvant (L/S = 10). L'extrait cyclohexane a été concentré sous pression réduite jusqu'à élimination totale du solvant. Le résidu sec était pesé suite à un passage de 24 h à l'étuve à 50°C.

Le résultat est exprimé en pourcentage par rapport à la matière sèche initiale selon l'équation :

$$\%L = \frac{\text{masse après évaporation} * 100}{\text{masse réelle introduite}}$$

Où masse réelle introduite est la masse sèche de la matière végétale extraite.

1.5. Détermination du potentiel en composés extractibles

Le système Tecator Fibertec M1017 (Foss) a été utilisé pour déterminer le rendement en composés solubles extraits à partir des coproduits du chanvre, avec les solvants d'extraction suivants : éthanol 60 %, éthanol 95 % et eau déminéralisée. Pour chaque matière et chaque solvant, les extractions ont été réalisées en triplicat.

1 g de matière première broyée à 0,5 mm a été pesé dans chacun des frittés et placé dans le Fibertec. 100 mL de solvant ont été ajoutés et l'extraction a été effectuée à la température d'ébullition du solvant pendant 1 h.

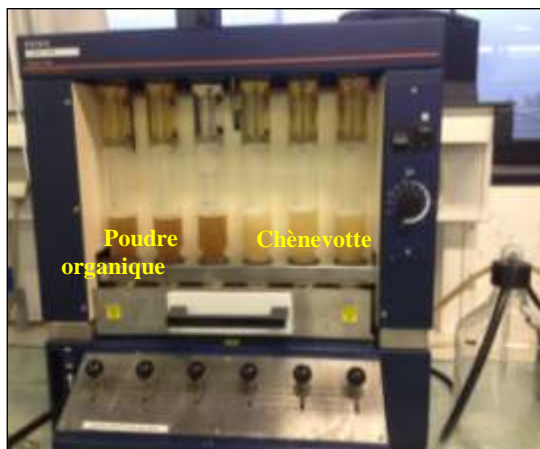


Figure 4 : Système Tecator Fibertec M1017

Afin d'éviter les pertes de vapeur, un circuit réfrigérant est mis en place dans l'extracteur.

L'extrait et les solutions de lavage sont récupérés par aspiration à l'aide d'une trompe à vide puis placés dans une fiole jaugée de 200 mL dont le volume est ajusté avec le solvant d'extraction. Les solutions de lavage sont les solutions récupérées par rinçages du résidu solide restant sur le fritté par le même solvant qui servi l'extraction.

Les extraits ont été stockés à -24 °C avant analyses.

Les taux de matière sèche, minérale et organique des extraits (10 à 15 g de chaque extrait) et des résidus restant dans les frittés, ont été déterminés selon la méthode décrite dans la partie 1.4.a.

Le rendement en composés extractibles (ou potentiel en extractibles) est exprimé en pourcentage par rapport à la matière organique initiale :

$$\text{Taux d'extractible (\%/MOi)} = \frac{MSe}{MOi} \times 100$$

Où :

- MSe = masse sèche totale de l'extrait (g) calculée comme suit :

$$MSe = \frac{m \text{ extrait} \times \%MS \text{ extrait}}{100}$$

m extrait : masse des 200 mL d'extrait récupérés (g)

%MS extrait : taux de matière sèche de l'extrait

- MO_i = masse de matière organique initiale (g), calculé comme suit :

$$MO_i = \frac{MSi \times (100 - \%MM)}{100}$$

MSi : masse initiale sèche du coproduit (g) déposé dans le creuset

%MM : taux de matière minérale du coproduit utilisé.

Le post-traitement des extraits consiste à concentrer à sec les solutions récupérées à l'aide d'un évaporateur parallèle compact à mouvement orbital (Multivapor P-12 BUCHI, voir Figure 5).

Ce dernier comprend 12 positions et permet d'évaporer en parallèle 12*30 mL d'échantillons en les chauffant de manière individuelle et en transférant la vapeur à l'unité de réfrigération.

Le résidu sec obtenu est ensuite dissous dans 5 mL du mélange eau/acétonitrile 50/50 (v/v) et conservé à -24°C pour le dosage des polyphénols totaux par la méthode Folin Ciocalteu et l'analyse des acides phénoliques par HPLC.



Figure 5 : Le multi-évaporateur (Multivapor P-12 BUCHI)

1.6. Extraction séquencée : caractérisation des liaisons éther et ester dans les coproduits du chanvre

Le schéma de l'extraction séquencée, divisé en trois étapes, est représenté dans la Figure 6.

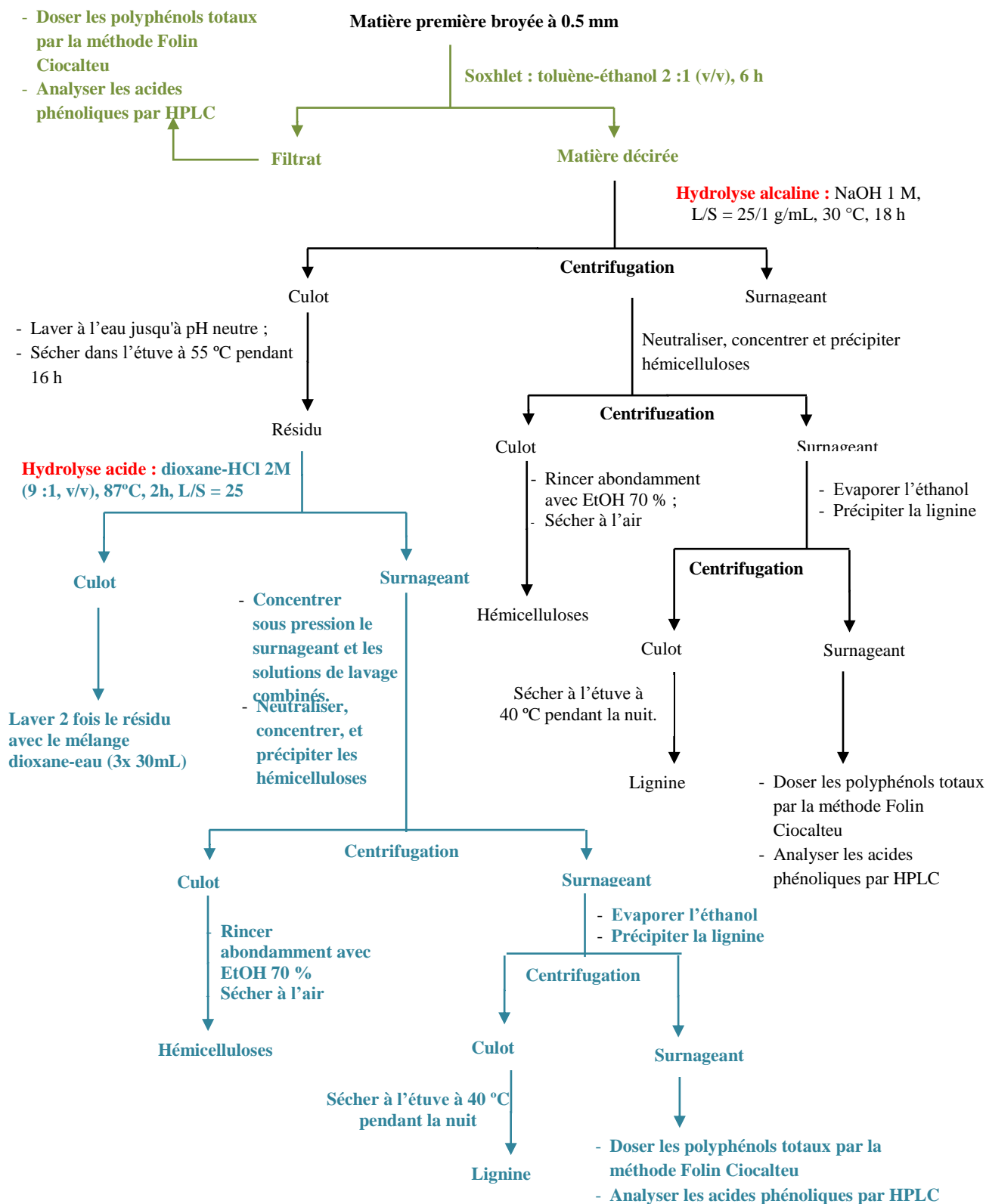


Figure 6 : Schéma global de l'extraction séquentielle

a. Etape I : Décirage et extraction des composés phénoliques libres

Cette étape consiste, à décirer la matière première pour son utilisation dans l'étape II. L'extrait obtenu peut contenir en plus de la cire, d'autres extractibles. Cela nous permet d'analyser l'extrait afin de quantifier les composés phénoliques présents et considérés comme libres.

Cette étape a été réalisée au Soxhlet en duplicat.

20 g de matière végétale ont été placés dans la cartouche et extraits pendant 6 heures avec 200 mL du mélange toluène-éthanol 2 :1 (v/v). L'extrait récupéré est concentré à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif et dilué de nouveau dans 15 mL du mélange eau/ acétonitrile 50/50 (v/v). Le mélange obtenu été conservé à -24°C pour les dosages (polyphénols totaux et acides phénoliques). Le résidu solide est placé à l'étuve ventilée à 40 °C jusqu'à atteindre un poids constant. Il est utilisé dans l'étape suivante.

b. Etape II : Acide férulique et acide *p*-coumarique estérifiés et les phénols associés (hydrolyse alcaline)**Hydrolyse alcaline**

Cette étape a été réalisée en multiréacteurs (*STEM Omni OS6250 Series Reaction Stations, Bibby Scientific*) en triplicat.

2 g du résidu déciré séché ont été placés dans chaque réacteur de 100 mL et hydrolysés avec 50 mL d'hydroxyde de sodium NaOH 1 M ($L/S = 25/1$ g/mL) à 30°C pendant 18 h sous atmosphère statique de N₂ et sous agitation (300 rpm). Les extraits obtenus ont subi ensuite un post-traitement afin de préparer les solutions finales à l'analyse. Après arrêt du système, le contenu des réacteurs a été centrifugé (Rotor 12500, 800 rpm, 7 °C, 15 min) afin de séparer les deux phases : solide et liquide.

Le culot solide a été lavé à l'eau jusqu'à pH neutre puis séché dans une étuve à 55 °C pendant 16 h. Il est alors prêt pour l'étape III.

Le liquide ainsi que l'eau de lavage ont été neutralisés avec une solution d'HCl 6 M jusqu'à pH = 6 puis concentrés à l'aide d'un évaporateur rotatif.



Figure 7 : Multiréacteurs

Récupération des hémicelluloses solubilisées

Les hémicelluloses solubilisées ont été récupérées par précipitation avec 3 volumes d'éthanol 95% puis séparées de la solution par centrifugation (Rotor 12 500, 9000 tpm, 10 °C, 5 min). Les hémicelluloses isolées ont été rincées abondamment avec de l'éthanol 70 % et séchées à l'air jusqu'à poids constant puis pesées.

Récupération de la lignine solubilisée

L'éthanol contenu dans la solution centrifugée ainsi que dans la solution de rinçage des hémicelluloses a été évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le pH de la solution résultante a été ajusté à 1,5 en utilisant une solution d'HCl 6 M afin de précipiter la lignine. Cette dernière a été séparée de la solution par centrifugation (rotors 12 166 ou 12 172, 9000 tpm, 20 °C, 10 min), séchée à l'étuve à 40 °C pendant 12h jusqu'à poids constant puis pesée.

Dosage des composés phénoliques

Suite à la précipitation séquentielle des hémicelluloses et lignine, la solution résultante a été analysée. Les polyphénols totaux ont été évalués par la méthode Folin Ciocalteu et les acides phénoliques (acides férulique et *p*-coumarique, et vanilline) par HPLC.

c. Etape III : Acide férulique et acide *p*-coumarique étherifiés (hydrolyse acide)

Hydrolyse acide

L'hydrolyse acide a été aussi réalisée en multi-réacteurs en triplicat.

Les culots solides issus de l'étape d'hydrolyse alcaline, préalablement pesés, ont été hydrolysés en milieu acide à 87 °C pendant 2 h sous agitation (300 tpm). Le volume du mélange dioxane-HCl 2M (9 :1, v/v) a été calculé en fonction de la masse du culot en considérant que le rapport L/S est égal à 25 mL/g.

Les extraits obtenus ont subi un post-traitement. Une fois le mélange refroidi, les phases solides et liquides ont été séparées par centrifugation (Rotor 12 500, 8000 tpm, 7 °C, 15 min).

Le culot solide a été lavé avec le mélange dioxane-eau (3x 30 mL). Le surnageant et les solutions de lavage ont été concentrés à l'évaporateur rotatif. Afin d'éliminer l'intégralité du dioxane, de l'eau a été ajoutée puis une nouvelle évaporation a été menée. Le pH des extraits concentrés a été ajusté à 6 avec une solution de NaOH 2M.

Récupération des hémicelluloses et lignines solubilisées

Le protocole pour la récupération des hémicelluloses et lignines ainsi que les dosages réalisés sur le liquide sont similaires à ceux de l'étape II.

A noter qu'au cours du protocole expérimental de l'hydrolyse séquencée et pour établir les bilans matières de cette expérience, le taux de matière sèche de la matière végétale a été déterminé après chacune des trois étapes. De plus, les masses des fractions solides et les masses et volumes des fractions liquides ont été évalués après chacune des sous-étapes suivantes :

- Centrifugation,
- Changement du pH après neutralisation et acidification,
- Concentration.

2. Fractionnement des coproduits du chanvre

2.1. Macération ou extraction en batch

La macération a été réalisée au moyen d'un dispositif simple composé d'un réacteur de capacité de 1 L thermostaté, d'un agitateur mécanique qui comprend une unité motrice, une tige et une pale d'agitation. Dans le réacteur, 25 g de matière végétale broyée à 0,5 mm ainsi que 400 mL du solvant d'extraction (éthanol 60 %, éthanol 95 % ou eau déminéralisée) sont introduits. Le rapport L/S choisi est de 16/1 g/mL. L'extraction a été effectuée à température ambiante, pendant 24 h et en duplicat pour chaque coproduit et chaque solvant d'extraction. La phase liquide est séparée de la phase solide par filtration sur Büchner.



*Figure 8 : Réacteur Batch
1 L- Macération*

Une fraction des extraits a été concentrée sous pression réduite au moyen d'un évaporateur rotatif puis reprise dans 15 mL d'un mélange eau/ acétonitrile 50/50 (v/v) et conservée à -24 °C avant d'être analysée (dosage des polyphénols totaux par la méthode Folin Ciocalteu et analyse des acides phénoliques par HPLC).

Les taux de matière sèche, minérale et organique ont été déterminés selon la méthode décrite dans la partie 1.4.a pour les extraits (10 à 15 g de chaque extrait) et les résidus solides après extraction.

2.2. Extractions Soxhlet

L'extraction Soxhlet permet une extraction par macération avec un renouvellement cyclique du solvant.

Pour chacun des trois solvants d'extraction (eau, éthanol 60 % et éthanol 95 %), les extractions ont été réalisées en duplicat pour chaque coproduit. 2 g de matière première broyée à 0,5 mm ont été introduits dans une cartouche réalisée avec du papier Joseph.

Un volume de 200 mL de solvant a été versé dans un ballon de 250 mL dans lequel ont été ajoutées 2 ou 3 pierres ponce. L'extraction a été effectuée pendant 6 h, durée considérée suffisante selon la littérature pour extraire les composés phénoliques.

Une fraction des extraits obtenus a été concentrée à sec au moyen d'un évaporateur rotatif puis reprise dans 25 mL d'un mélange eau/acétonitrile 50/50 (v/v) et conservée à -24 °C avant d'être analysée (dosage des polyphénols totaux par la méthode Folin Ciocalteu et analyse des acides phénoliques par HPLC).

Les taux de matière sèche, minérale et organiques ont été déterminés selon la méthode décrite dans la partie 1.4.a pour les extraits (10 à 15 g de chaque extrait) et les résidus solides après extraction.

2.3. Extraction accélérée par solvant ASE

L'extraction accélérée par solvant a été réalisée au moyen d'un appareil le Dionex ASE 350 (*Thermo Scientific Dionex ASE 350 Accelerated Solvent Extractor*).

a. Essais préliminaires

L'extraction a été effectuée à 50 °C pour l'éthanol et 80 °C pour l'eau et à une pression d'environ 100 bars. La matrice (matière inerte) utilisée était l'Hydromatrix. En effet, comparé au sable de Fontainebleau, l'Hydromatrix est un support plus adapté à nos matières premières. Cette information a été déduite de la comparaison de l'efficacité des deux matrices sur le « Lot N°1 » de chènevotte.

Les conditions opératoires citées ci-dessus ont été appliquées. Les deux types de matrices, le sable Fontainebleau et l'Hydromatrix, ont été comparés. Les teneurs en composés phénoliques totaux dans chacun des extraits obtenus ont été dosées et exprimées en mg d'EAG/g de MS_i (Tableau 1).



Figure 9 : Extracteur ASE
(manuel d'utilisation)

Tableau 1: Rendements en composés phénoliques totaux dans les extraits issus de l'extraction par ASE (exprimés en mg d'EAG/g de MS_i)

Matrice	Solvant d'extraction		
	Eau	Ethanol 60 % (v/v)	Ethanol 95 % (v/v)
Sable de Fontainebleau	1,7 ± 0,1	3,0 (n = 2)	1,8 ± 0,1
Hydromatrix	2,1 ± 0,6	3,3 ± 0,5	1,9 ± 0,1

Les résultats obtenus avec le sable de Fontainebleau et l'Hydromatrix sont comparables pour l'éthanol 60 % (v/v) et l'éthanol 95 % (v/v). En revanche, l'existence d'interactions entre la matrice et la chènevotte est mise en évidence dans le cas de l'extraction à l'eau. En effet, une amélioration des rendements en composés phénoliques est observée lors de l'utilisation de l'Hydromatrix : 2,1 mg d'EAG/g de MS_i ont été dosés dans les extraits contre 1,7 mg d'EAG/g de MS_i pour les extraits issus de l'ASE au sable de Fontainebleau. Donc, l'Hydromatrix permet d'extraire 24 % de composés phénoliques en plus comparativement au sable de Fontainebleau.

b. Préparation des échantillons

Les cellules de 10 mL utilisées sont des tubes en acier inoxydable scellés de part et d'autre par des bouchons à visser qui présentent chacun une petite ouverture centrale pour l'écoulement du solvant.

Pour la préparation des échantillons, un filtre en fibre de verre de 27 mm est placé dans la partie inférieure de la cellule pour ne pas boucher le fritté de la capsule inférieure. La matrice ou de la matière inerte est ensuite ajoutée au-dessus du filtre : 1 g de sable de Fontainebleau ou 1,5 g d'Hydromatrix. Suite à des études préliminaires, un rapport volumique d'environ 1/3 matrice/matière végétale a été choisi pour remplir les cellules et pour ne pas causer des problèmes de fonctionnement lors de l'extraction. Ainsi 2 g de chènevotte ou 2,5 g de poudre de chanvre sont mélangés avec la matrice choisie, versés dans la cellule et tassés. Ensuite ils sont complétés avec la matrice choisie pour l'étude afin de remplir la cellule, tasser et fermer la cellule.

c. Fonctionnement de l'ASE

1) Préparation de l'appareil

Trois bouteilles de solvant ont été utilisées : la bouteille notée A (isopropanol) a été utilisée pour rincer les tuyaux lors de l'usage de solvants non miscibles. Les bouteilles notées B et C ont été utilisées pour les solvants d'extraction. L'air comprimé (régulateur de pression) et l'azote (pour purger le solvant hors de la cellule) sont nécessaires pour le bon fonctionnement de l'appareil.

Les cellules ainsi que les vials de collecte de l'extrait (60 mL) ont été placés dans les fentes des plateaux par ordre numérique. Les tuyaux ont été rincés avec le solvant d'extraction (25 mL solvant B) avant chaque extraction.

2) Choix de la méthode

Les paramètres expérimentaux ont été choisis à partir de travaux antérieurs effectués au Laboratoire de Chimie Agro-industrielle (Tableau 2). La plupart d'entre eux sont définis par l'opérateur sauf la pression d'extraction et la durée de vidange des cellules à la fin de l'extraction qui sont des paramètres fixes de l'appareil.

Tableau 2 : Conditions opératoires associées à l'extraction ASE

	Solvant	T (°C)
Température d'extraction	Ethanol 60 % (v/v)	50
	Ethanol 95 % (v/v)	50
	Eau distillée	80
Temps de chauffe de la cellule	Quelques minutes	
Préchauffe de la cellule	Aucun	
Pression d'extraction	50-200 bars (par défaut) Dans notre cas : maximum 115 bars.	
Nombre de cycles statiques	3	
Durée d'un cycle statique	5 min	
Durée de la vidange de la cellule (purge)	100 s (par défaut)	
Volume de rinçage (flush)	5 mL (100 %)	

La durée totale de l'extraction est d'environ 26 min.

Une par une, les cellules sont transportées dans un four où elles sont chauffées à la température souhaitée. Le solvant est introduit dans la cellule sélectionnée jusqu'à ce que celle-ci soit remplie.

Le nombre de cycles définit le nombre d'extractions successives avec les mêmes conditions opératoires sur une même cellule avec du solvant pur à chaque extraction.

Durant une durée d'extraction statique, le contact du solvant avec la matière est maintenu à la température choisie. Le solvant d'extraction est ensuite évacué.

Le « flush » est fixé à 100 % pour récupérer, lors de la vidange de la cellule, la totalité du solvant utilisé.

3) Traitement des échantillons

10 mL de chaque extrait récupéré dans les vials ont été concentrés à sec à l'aide du multivapor et redissous dans 2 mL du mélange eau/acétonitrile 50/50 (v/v). Cette solution a été ensuite conservée à -24 °C avant d'être analysée (dosage des polyphénols totaux par la méthode Folin Ciocalteu et analyse des acides phénoliques par HPLC).

Les taux de matière sèche, minérale et organique ont été déterminés selon la méthode décrite dans la partie 1.4.a pour les extraits.

2.4. Hydrolyse alcaline en batch

a. Etude préliminaire

Le protocole expérimental de cette étude a été choisi en se référant aux travaux de Bauer, Harbaum-Piayda, et Schwarz 2012.

Dans chacun des 5 réacteurs de 100 mL (*STEM Omni OS6250 Series Reaction Stations, Bibby Scientific*) (Figure 7), 2 g de chènevotte Lot N°1 (broyée à 2 mm) et un volume donné de NaOH sont mis en contact. Différentes concentrations ont été étudiées (Tableau 3). L'hydrolyse a été effectuée à température ambiante pendant 18 h et sous agitation (300 rpm). Une faible quantité d'hydrogénosulfite de sodium NaHSO_3 a été ajoutée à la solution alcaline dans le cas du réacteur 5 afin d'éviter la dégradation et/ou l'oxydation des acides phénoliques (Tilay *et al.* 2008).

A la fin de l'extraction, une centrifugation conduit à la séparation S/L. Le liquide est acidifié et les composés d'intérêt sont extraits par 3 extractions liquide/liquide consécutives à l'acétate l'éthyle. Après concentration à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif et dilution dans 10 mL de méthanol, les polyphénols totaux ont été dosés par la méthode Folin Ciocalteu et les acides phénoliques ont été analysés par HPLC (Figure 10).

Tableau 3 : Etude préliminaire : conditions opératoires

	Réacteur 1	Réacteur 2	Réacteur 3	Réacteur 4	Réacteur 5
L/S	30	30	30	10	30
% NaOH/ MO_i	120	240	480	80	240
NaHSO_3 (%)	0	0	0	0	3

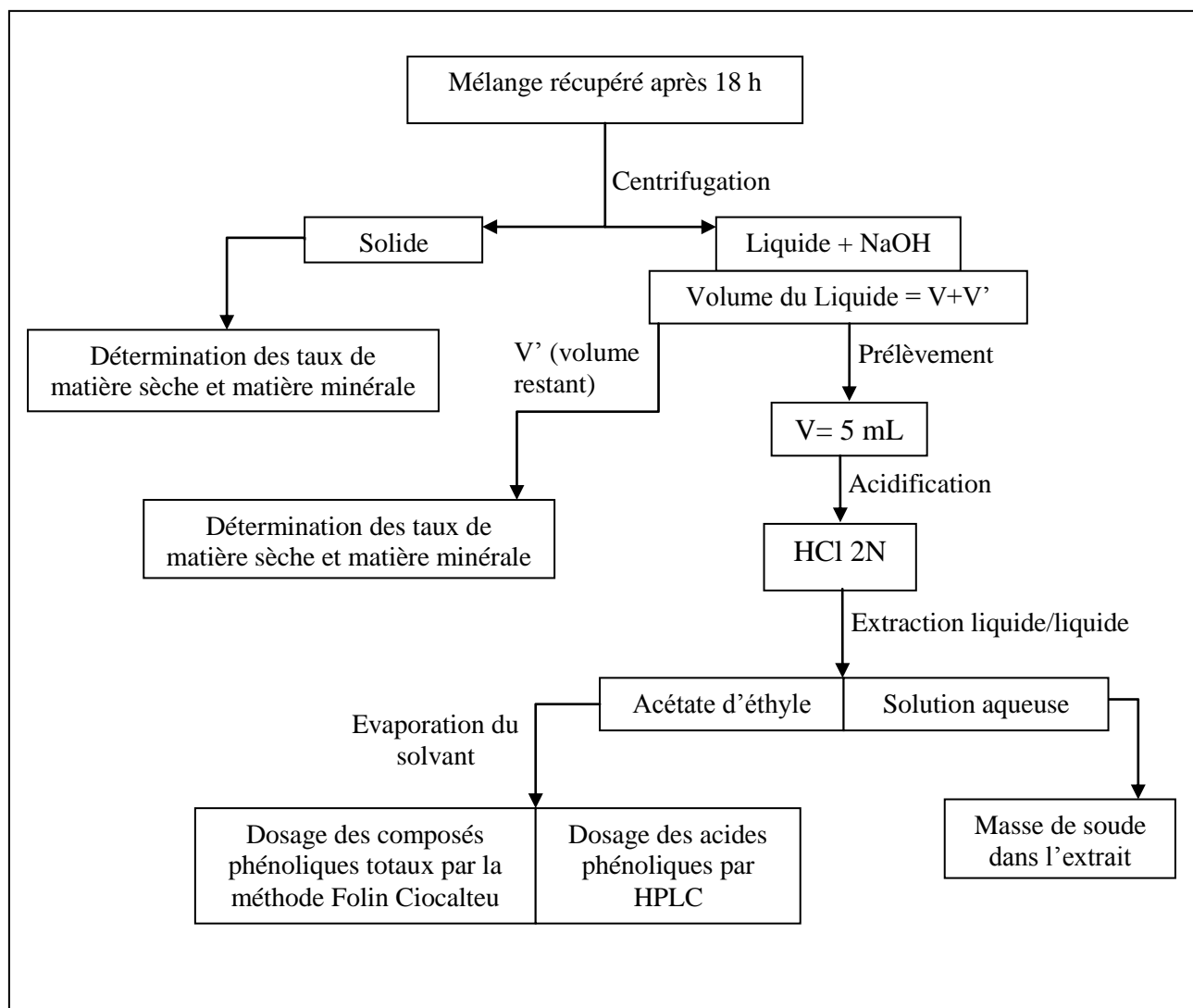


Figure 10 : Schéma représentant le post traitement des échantillons issu de l'étude préliminaire de l'hydrolyse alcaline

Les résultats obtenus ont montré que :

- Le rendement en composés phénoliques le plus élevé (3,6 mg d'EAG/gMSi) a été obtenu par hydrolyse avec NaOH 4M,
- l'ajout de NaHSO₃ a pour but de conserver les composés phénoliques dans la solution et de limiter leur oxydation. On remarque un rendement en composés phénoliques totaux plus élevé en présence de NaHSO₃ tandis que la teneur en acide coumarique reste identique. Ces résultats montrent qu'environ 30 % des acides phénoliques extraits, sous ces conditions opératoires, ont

été transformés par oxydation. Dans le cas de l'acide coumarique, ce dernier semble être stable dans le milieu réactionnel,

- la diminution du rapport L/S à 10 mL/g pour une concentration de soude de 2 M, montre une diminution du rendement,
- l'acide férulique n'a pas été détecté dans les extraits. Cela peut être lié à sa faible teneur dans la chènevotte et/ou aux pertes dues à la cascade d'étapes du protocole appliqué. Le protocole a été adapté pour la suite.

b. Protocole expérimental retenu

10 g de matière première et 300 mL d'une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) 4 M ont été introduits dans un réacteur de 1 L pour être hydrolysés, à 20 °C, pendant 24 h et sous agitation.

La phase liquide a été séparée de la phase solide par centrifugation (Rotor 12 500, 15 min, 7 °C, 9600 rpm) et utilisée pour doser les polyphénols totaux par la méthode Folin Ciocalteu.

L'extrait a été neutralisé par une solution d'acide chlorhydrique 6 M jusqu'à pH 6. Les hémicelluloses solubles ont été séparées du reste de la solution par précipitation avec 3 volumes d'éthanol 95 % suivie d'une centrifugation (Rotor 12 500, 5 min, 10 °C, 9000 rpm).

L'éthanol a été éliminé par concentration de la solution résultante à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'extrait concentré a été acidifié avec une solution d'acide chlorhydrique 6 M jusqu'à pH 2 pour permettre l'analyse des composés phénoliques. Cette dernière a été conservée à - 24 °C avant analyses des acides phénoliques par HPLC.

2.5. Extraction en extrudeur bi-vis BC21

a. Présentation de l'extrudeur BC21

L'extrudeur bi-vis BC21 (Clextral) est constitué de 2 vis parallèles et identiques, co-rotatives et co-pénétrantes, tournant en même temps et à la même vitesse dans un fourreau bilobé. Ces vis sont portées par deux arbres parallèles séparés de 21 cm. Le fourreau est composé de 7 modules de 10 cm de long chacun assemblés par des colliers. Chaque module fermé peut être, soit chauffé, soit refroidi par une circulation d'eau. La régulation thermique est assurée

individuellement sur chaque module du fourreau par contrôle du chauffage et du débit d'eau de refroidissement. Certains modules ouverts permettent l'introduction de solides comme c'est le cas pour le module 1 (ouvert sur le haut) ou l'écoulement de l'extrait par filtration comme pour le module 6 (ouvert en bas). Tous les modules peuvent être alimentés par des liquides *via* des petites ouvertures pratiquées sur les côtés des fourreaux au niveau desquels des périphériques d'alimentation liquide peuvent être connectés.

b. Equipements périphériques

- **Trémie d'alimentation solide** : KTRON de type K 2ML D5 S60 d'un volume de 50L et d'une puissance de 0,55 kW pour une vitesse maximale de 87 Hz.
- **Pompe d'alimentation liquide 1** : DKM de type K20 2 KAMP 112/16 délivrant un débit maximal de 24 L.h⁻¹.
- **Pompe d'alimentation liquide 2** : Clextal de type Super K PP16 délivrant un débit maximal de 33 L.h⁻¹.

c. Configuration du profil de vis

Un choix très étendu d'éléments de vis est disponible de manière à assurer très précisément et avec souplesse les différentes fonctions : convoyage, cisaillement et broyage, compression et détente, mélange, réaction chimique, extraction liquide/solide, séparation liquide/solide (Rigal 1996).

- Les vis de convoyage sont des vis à pas direct qui assurent principalement une action de transport.
- Les disques malaxeurs exercent un fort effet de compression radiale sur la matière qui est ainsi écrasée contre la paroi du fourreau. Ils favorisent de forts effets de cisaillement et de mélange sur la matière. En fonction de leur angle de montage selon un pas direct ou inverse, une action plus ou moins forte de convoyage ou de compression axiale peut également être obtenue en combinaison avec les vis à pas direct. L'arrangement des unités bilobées entre elles peut donner un élément de vis de forme hélicoïdale de pas direct ou inverse ou un élément de pas neutre si les unités sont arrangées en quinconce.

- Enfin, les éléments de vis à pas inverse (ou contrefilets) sont les éléments restrictifs les plus importants du profil, car ils permettent un mélange et un cisaillement intense de la matière ainsi qu'une augmentation de son temps de séjour. Fréquemment utilisés pour la mise en pression de la matière, les contre-filets sont indispensables à la séparation d'une phase liquide et d'une phase solide par pressage (Rigal 1996). Un bouchon de matière (ou bouchon dynamique) peut alors être formé et la récupération de l'extrait liquide ainsi exprimé se fait par la mise en place d'un module de filtration en amont des contre-filets.

Défini par l'arrangement des différents éléments de vis (nature, angle, longueur, pas), le profil de vis est le principal facteur qui influence l'efficacité du procédé d'extrusion bi-vis. Sa remarquable modularité permet notamment d'agir sur la transformation de la matière, sur la distribution de son temps de séjour et sur l'énergie mécanique transmise pendant le procédé d'extrusion (Gogoi, Choudhury, et Oswalt 1996 ; Choudhury, Gogoi, et Oswalt 1998 ; Gautam et Choudhury 1999 ; Evon *et al.* 2010).

Les profils finaux appliqués pour l'extraction des composés phénoliques à partir de la chènevette et de la poudre de chanvre ont en commun les éléments de vis décrits ci-après (Figure 11) :

- **T2F et C2F** : Vis à pas direct et à double-filets qui assurent principalement le convoyage de la matière. La forme des filets est trapézoïdale dans le cas des vis T2F et conjuguée pour les C2F. Les vis trapézoïdes ont des meilleures caractéristiques de convoyage que les vis conjuguées, elles assurent l'avancement de la matière dans le module d'introduction du solide. La combinaison des différents pas de vis existants permet la mise sous pression de la matière (pas de vis décroissants), d'autant plus que celle-ci avance dans le profil.
- **Mal 2** : Ce sont des disques malaxeurs bilobes. Ces petits éléments configurés ici par série de 5 sur chaque vis, pour un angle de montage de 90° confèrent un bon effet de mélange avec un effet de convoyage nul.
- **CFC2** : Les vis à pas inverse choisies permettent un mélange et un cisaillement intense de la matière. Les filets de ce type d'éléments sont ajourés et disposés à 120° afin de permettre un débit de fuite pour la matière comprimée.



Figure 11 : Eléments de vis utilisés pour le profil d'extrusion bi-vis N°2 : (a) vis de convoyage, (b) malaxeurs, (c) contrefilets

Tableau 4 : Vis utilisées en extracteur bi-vis BC21 avec leurs effets : Profil N°2

Elément de vis	Référence	Mélange	Cisaillement	Convoyage	Pas de vis (mm)	Longueur (cm)
Vis de convoyage à double-filet (trapézoïdale ou conjuguée)	T2F50	+	+	+++	50	10
	C2F33	+	+	+++	33	25
	C2F25	+	+	+++	25	21,25
	C2F16	+	+	+++	16	7,5
Disques malaxeurs	MAL 2	++++	++	Neutre	Aucun	5
Contrefilets	C2FC-25	+++	++++	---	-25	1,25

Les débits solides et liquides sont adaptés de façon à avoir des ratios liquide/solide entre 6 et 12. Le ratio est calculé en divisant le débit liquide (kg/h) par le débit solide (kg/h) dont la teneur en matière sèche a été préalablement mesurée. Chaque extraction bi-vis a été réalisée sur 15 minutes à régime constant après avoir stabilisé les paramètres d'extraction. Chaque extraction n'a été réalisée qu'une fois pour des raisons logistiques de mise en œuvre de la bi-vis.

d. Post-traitement des filtrats

Les filtrats ont été centrifugés afin obtenir un extrait clair et un culot de centrifugation (Tableau 5). Les teneurs en matières sèches, minérales et organiques dans les surnageants et les culots ont été déterminées (se référer à la partie 1.4). Afin de pouvoir être analysés, 40 mL de chaque surnageant alcalin ont été acidifiés à pH 5. L'ensemble des filtrats a été analysé par HPLC et par la méthode de Folin-Ciocalteu.

Tableau 5 : Paramètres de centrifugation des filtrats récupérés en sortie d'extrudeur

Essais	Rotor	vitesse	T (°C)	Durée (min)
Sans soude	12 500	9 000	7	10
Avec soude	12 500	9 600	7	15

e. Post traitement des extrudats

Les teneurs en matières sèche, minérale et organique des extrudats ont été déterminées (se référer à la partie 1.4.a). Les teneurs en cellulose, hémicellulose et lignine restantes dans les extrudats des essais P8, P9, CH8 et CH9 ont été évaluées en utilisant la méthode de *Van Soest and Wine* (se référer à la partie VI.1.4.c).

Dans un deuxième temps, la teneur en composés extractibles résiduels dans les extrudats P8, P9, CH8 et CH9 a été déterminée en extracteur Tecator Fibertec par extraction à l'eau, l'éthanol 60 % et l'éthanol 95 % (se référer à la partie 1.5). Les extraits obtenus ont aussi été analysés par HPLC et par la méthode de dosage Folin-Ciocalteu.

2.6. Extraction assistée par micro-ondes

L'appareil utilisé est le « *CEM MARS 5 microwave accelerated reaction system* ».

a. Remarques sur la faisabilité de l'extraction liquide/solide en réacteurs micro-ondes

Lors des essais préliminaires, certains verrous technologiques ont été observés au niveau de l'appareil :

- La pression est limitée à 24 bars selon le manuel d'utilisation de l'appareillage.
- Des pertes de liquide ont été observées au niveau des réacteurs pendant le processus de chauffage, majoritairement une fois que la température d'ébullition du solvant était atteinte (78 °C pour l'éthanol et 100 °C pour l'eau à pression atmosphérique). Ces pertes se situent à deux endroits : soit au niveau du bouchon-vis qui sert à éviter la surpression dans le réacteur (sous lequel est placée une membrane qui peut se percer si le réacteur est en surpression) ; soit au niveau de l'emboîtement du bouchon et du tube du réacteur (Figure 12). Ces pertes, dues à la faible étanchéité des réacteurs, diffèrent en fonction des réacteurs. Sur l'ensemble des manipulations réalisées, on a pu constater une moyenne de pourcentage de perte de 86,10 % +/- 11,15 %. Cela peut représenter pour certains échantillons plus de 30% de pertes.

Afin de minimiser ces dernières, la seule solution a été de travailler à des températures légèrement inférieures aux températures d'ébullition.

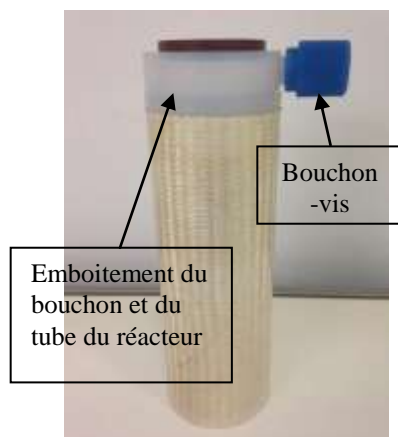


Figure 12 : Photographie d'un réacteur micro-onde

b. Conditions opératoires d'extraction en réacteur micro-ondes

2 g de chènevotte et 32 mL de solvant d'extraction (L/S : 16/1 g/mL) ont été introduits dans le réacteur. Les solvants d'extraction utilisés sont l'éthanol 60 % (v/v), l'éthanol 95 % (v/v) et l'eau. Pour certains essais, de l'hydroxyde de sodium a été ajouté au solvant d'extraction.

Il est recommandé, selon le manuel d'utilisation, de ne pas dépasser le 1/3 du volume du réacteur qui est de 100 mL avec possibilité d'utiliser 10 réacteurs par analyse.

Les paramètres qui ont été choisis pour l'extraction sont présentés dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Conditions opératoires d'extraction en réacteur micro-ondes

Conditions opératoires		
Température	Durée de rampe pour	Palier
	4 min	3 min
Puissance de 100 %	Nombre de réacteurs	Puissance (W)
	1-2	300
	3-5	600
	6 ou plus	1 200
Température d'extraction	Solvant	Température (°C)
	Eau	50 ou 100
	Ethanol	50

Pour chaque jeu de conditions opératoires, 4 réacteurs ont été utilisés pour l'extraction de la chènevotte et 4 réacteurs pour celle de la poudre organique. A l'issue de l'extraction et après refroidissement des réacteurs, les extraits ont subi un post-traitement.

c. Post-traitement des échantillons

La phase liquide a été séparée de la phase solide par centrifugation (9 000 rpm, 20 °C, 10 min, rotor 12 172). Les 4 phases liquides, issues des 4 réacteurs mis en œuvre dans des conditions opératoires identiques, sont regroupées après centrifugation. Il en est de même pour les solides séparés par centrifugation. L'extrait obtenu a été conservé à -24 °C pour les dosages (dosage des polyphénols totaux par la méthode Folin Ciocalteu et analyse des acides phénoliques par HPLC). Les taux de matière sèche, minérale et organiques ont été déterminés dans les extraits et les résidus solides selon la méthode décrite dans la partie 1.4.a pour les extraits.

3. Méthodes d'analyse

3.1. Dosage des polyphénols totaux contenus dans un extrait

Le dosage des composés phénoliques totaux a été réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu adapté de la méthode de Singleton et Rossi (Singleton et Rossi, 1965). Ce dosage repose sur une réaction de réduction, en milieu alcalin, d'une solution jaune de complexes polymériques ioniques formés à partir d'acides phosphotungstiques et phosphomolybdiques en un complexe bleu de molybdo-tungstènes par les phénols présents dans l'extrait à doser.

Afin de préparer les extraits à doser, les tubes de 15 mL en pyrex et contenant 1 mL d'extrait (ou 1 mL d'eau distillée pour le blanc d'analyse), 0,5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu, 1 mL de carbonate de sodium (20 %, w/w), et 7,5 mL d'eau distillée, ont été mélangés au vortex puis placés dans un bain-marie à 70 °C pendant 10 min. La réaction a été ensuite stoppée en plongeant les tubes dans un bain d'eau froide.

La coloration bleue du complexe tungstomolybdique réduit du mélange réactionnel est alors proportionnelle à la concentration en polyphénols de solution testée.

L'absorbance des extraits a été mesurée avec un spectrophotomètre ultraviolet UVD 1800 à la longueur d'onde de 700 nm dans des cellules en quartz de 1 cm de trajet optique (loi de Beer-Lambert).

Pour préparer la gamme d'étalonnage permettant de calculer les concentrations des composés phénoliques dans nos extraits, des solutions d'acide gallique avec des concentrations croissantes ont été préparées. Les mêmes étapes de préparation du mélange réactionnel ont été suivies mais en remplaçant 1 mL d'extrait par 1 mL d'une solution d'acide gallique de concentration connue. La concentration en composés phénoliques d'un extrait est déterminée en rapportant l'absorbance de l'extrait sur la droite d'étalonnage.

Les teneurs en composés phénoliques totaux dans les extraits ont été calculées en ramenant la valeur de la concentration qui est exprimée en mg d'EAG/mL aux unités suivantes : mg d'EAG/g MO_i, en %/MS_E et en %/MO_E selon les équations suivantes :

$$\% d'EAG/gMOi = \frac{\text{masse de PP dans l'extrait}(mg) * 100}{MOi (g) * 1000}$$

Ce pourcentage multiplié par 10 permet d'exprimer la teneur de composés phénoliques en mg d'EAG/g MO_i.

$$\% d'EAG/gMSE = \frac{\text{masse de PP dans l'extrait}(mg) * 100}{MS extraite (g) * 1000}$$

$$\% d'EAG/gMOE = \frac{\text{masse de PP dans l'extrait}(mg) * 100}{MO extraite (g) * 1000}$$

Où :

- MO_i : Masse de matière organique initiale contenue dans la matière végétale.
- MS extraite ou MSE : Masse de matière sèche extractible dans l'extrait.
- MO extraite ou MOE : Masse de matière organique extractible dans l'extrait.

3.2. Dosage des acides phénoliques par chromatographie en phase liquide à haute performance

La séparation des monomères aromatiques a été effectuée par un système de chromatographie en phase liquide haute performance associant une pompe (P680) et un détecteur à barrette de diodes (Dionex (DAD) UVD340U). Un injecteur automatique (ASI-100) est également utilisé. Le système est équipé d'une colonne apolaire Omnispher 3 C₁₈ (longueur : 100 mm, taille des particules : 3 µm, diamètre interne : 3 mm) (Varian) et d'une colonne de garde, lesquelles sont installées dans un compartiment thermorégulé Ultimate 3000 column compartment (Dionex, USA). L'acquisition des données est réalisée au moyen du logiciel Chromeleon 6.80 Chromatography Data System (Dionex, USA).

L'élution a été effectuée avec un gradient d'élution impliquant : éluant A (eau acidifiée, H₂O/H₃PO₄ 10⁻²M) et éluant B (100 % acétonitrile) avec un débit constant de 0,7 mL/min. Le gradient d'élution est le suivant : 0 min 5 % B ; 10 min, 10 % B ; 20 min 36 % B ; 25 min 100 % B ; 30 min 100 % B ; 31 min 5 % B et 32 min 0 % B. Les analyses sont réalisées en injectant 10 µL d'extrait. La température en colonnes est maintenue à 30 °C.

Les acides phénoliques séparés par HPLC ont été identifiés par comparaison de leur temps de rétention et de leur spectre UV avec ceux de composés étalons (Annexe 3).

Une série d'étalons commerciaux a été injectée dans les mêmes conditions opératoires afin de pouvoir identifier des composés autres que ceux ciblés dans l'étude (Tableau 7). Les spectres UV de ces étalons sont présentés en Annexe 3.

Tableau 7 : Autres composés phénoliques analysés

Molécule injectée	t _R (min)	Molécule injectée	t _R (min)
Acide gallique	1,45	Acide syringique	11,48
Acide 4-hydroxybenzoïque	6,26	(-) Epicatéchine	13,56
Acide vanillique	9,49	Syringaldéhyde	14,79
4-hydroxybenzaldéhyde	10,37	Acide sinapique	15,96
Acide caféique	10,42	Acide <i>m</i> -coumarique	16,66

Les composés phénoliques ont été quantifiés par étalonnage externe à 280 nm.

Pour préparer la gamme d'étalonnage permettant de calculer les concentrations des composés phénoliques dans nos extraits, des solutions d'étalons filles ont été préparées par dilution de solutions étalons mères. Deux solutions mères concentrées (SM1 et SM2) contenant un mélange : acide férulique + vanilline (+ parfois acide cinnamique) ainsi que deux autres solutions (SM3 et SM4) contenant l'acide *p*-coumarique ont été préparées pour une quantification représentative de l'ordre de grandeur de ces composés dans les extraits.

Les solutions mères ont été préparées à partir des pesées suivantes :

SM1 : 100,2 mg de vanilline et 20,3 mg d'AF ; SM2 : 41 mg de vanilline et 10,6 mg d'AF ;
SM3 : 20,1 mg d'ApC et SM4 : 15,3 mg d'ApC.

Chacune d'entre elles est d'un volume de 100 mL avec comme solvant un mélange eau/acétonitrile 50:50.

Des solutions filles ont été préparées par dilution de ces solutions (Tableau 8) pour chacune des campagnes d'analyse.

Les concentrations finales des solutions filles ont été calculées en utilisant un facteur de dilution, lui-même défini en fonction des masses des solutions mère et de celles du solvant, pesées dans le vial correspondant destiné à l'analyse.

L'étalonnage a été régulièrement vérifié par injection d'étalons au début de chaque campagne d'analyse. Chaque solution a été injectée deux fois.

Tableau 8 : Exemple de préparation de gamme étalon lors d'une des campagnes d'analyse

N° du vial	Dilution	[Vanilline] (mg.L)	[Acide Férulique] (mg.L)	[Acide <i>p</i> - Coumarique] (mg.L)
1c	SM1/10	95,40	19,33	-
1d	SM1/20	48,24	9,77	-
1e	SM1/15	66,42	13,46	-
2a	SM2/4	103,35	26,72	-
2b	SM2/10	39,99	10,34	-
2c	SM2/20	20,42	5,28	-
2d	SM2/100	4,29	1,11	-
3a	SM3/2	-	-	100,45
3b	SM3/4	-	-	50,36
3c	SM3/10	-	-	19,84
3d	SM3/20	-	-	10,09
3e	SM3/1	-	-	201
4a	SM4/2	-	-	77,09
4b	SM4/5	-	-	30,85
4c	SM4/10	-	-	14,92
4e	SM4/1	-	-	153

SM1 : 1002mg/L vanilline et 203mg/L d'acide férulique ; SM2 : 410 mg/L vanilline et 106 mg/L d'acide férulique ; SM3 et SM4 contenant respectivement 201 et 153 mg/L d'acide *p*-coumarique

Les droites d'étalonnage associées à cette campagne sont représentées dans la Figure 13.

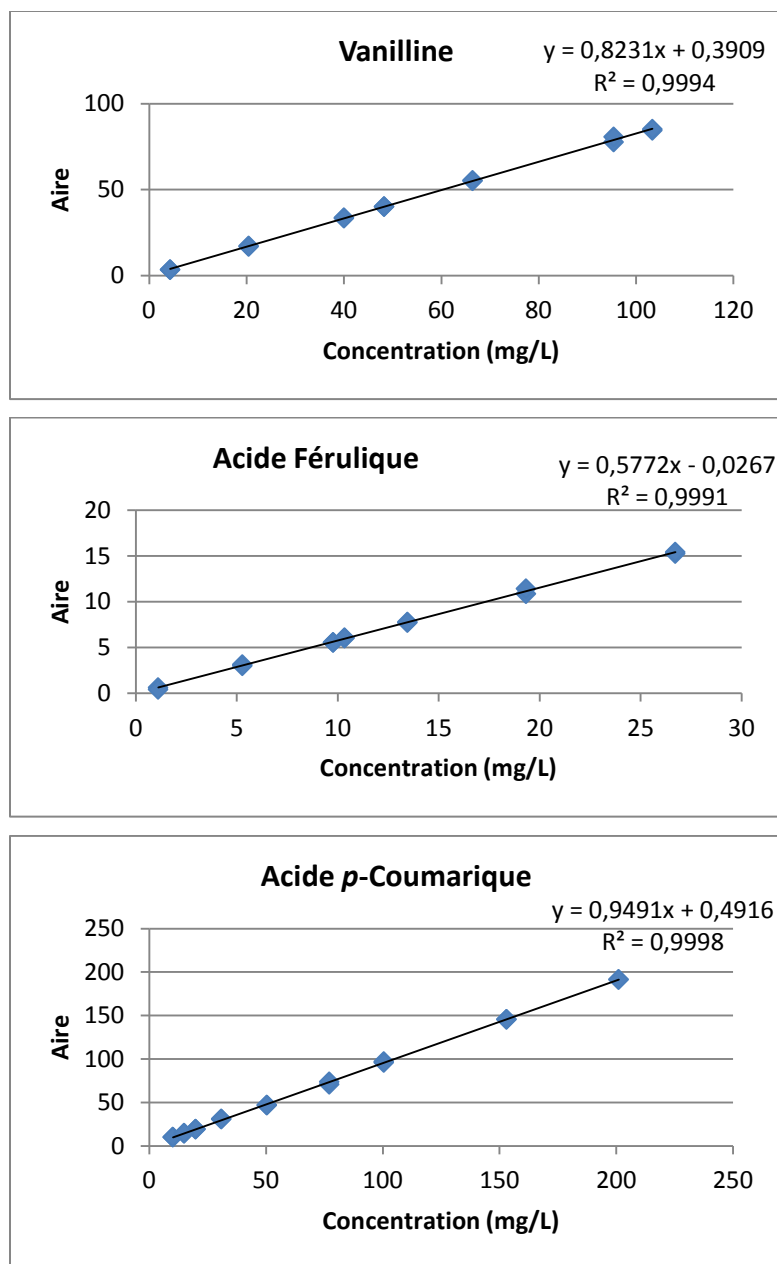


Figure 13 : Droites d'étalonnage de la vanilline, de l'acide férulique et de l'acide p-coumarique correspondant à la campagne représentée dans le Tableau 8 et quantifiés pour $\lambda = 280\text{nm}$

Les limites de détection et de quantification ont été étudiées à partir de l'étude du rapport signal/bruit (Tranchant 1995).

La limite de détection (LD) est la plus petite concentration ou teneur de l'analyte pouvant être détectée, avec une incertitude acceptable, mais non quantifiée dans les conditions expérimentales décrites de la méthode.

La limite de quantification (LQ) est la plus petite concentration ou teneur de l'analyte pouvant être quantifiée, avec une incertitude acceptable, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode.

Une estimation a été réalisée à partir de la lecture directe du signal sur les chromatogrammes de solutions étalons les moins concentrées. La limite de détection a été estimée égale à trois fois la hauteur du bruit de fond. La limite de quantification, quant à elle, a été estimée égale à dix fois la hauteur du bruit de fond. Les valeurs obtenues sont présentées dans le Tableau 9.

Tableau 9 : LD et LQ calculées en mg/L pour les acides férulique, *p*-coumarique, cinnamique et pour la vanilline

	y=ax+b (pour $\lambda = 280$ nm)					Domaine de linéarité
	a	b	r^2	LD	LQ	
Acide férulique	0,3	0,03	0,999	0,5	1,7	<25mg/L
Acide <i>p</i> -coumarique	0,6	7,2	0,995	0,4	1,4	<500mg/L
Acide cinnamique	1,1	0,05	0,999	0,1	0,4	<25mg/L
Vanilline	0,5	0,3	0,999	0,4	2,9	<100mg/L

ND : Non Déterminé

4. Concentration des extraits

Trois zéolithes de caractéristiques différentes ont été sélectionnées pour cette étape : deux faujasites USY 50 et USY 30 (structure type FAU) et une zéolithe BETA (structure type BEA), ainsi que la résine Amberlite XAD-16, un adsorbant polymérique de styrène-divinylbenzène.

Les manipulations ont été effectuées dans un premier temps sur des solutions aqueuses modèles d'acides cinnamique, *p*-coumarique et férulique, de concentration variant de 10 à 500 mg/L, puis sur des extraits issus de l'extraction de la chènevotte avec l'éthanol 96 % en réacteur micro-ondes et avec l'eau par extrusion bi-vis.

Tableau 10 : Principales caractéristiques des zéolithes étudiées

Adsorbant	Taille des pores (nm)	Rapport molaire Si/Al	surface BET (m ² /g)
USY30	0,74 ^a	14,5	749 ^b
USY50	0,74 ^a	25	675 ^b
BETA	0,66 × 0,67 ^a 0.56 × 0,56 ^a	88	659 ^b
XAD16	-		≥ 800

^a *Atlas of zeolite framework types* (Baerlocher, Meier, et Olson 2001)

^b Déterminé par l'équipe Matériaux à porosité contrôlée de l'Institut des Sciences et Matériaux de Mulhouse (IS2M) (UMR CNRS 7361).

a. Préparation des adsorbants

Avant utilisation, les zéolithes ont été conditionnées à 140 °C pendant 36 h. La résine XAD-16, quant à elle, est immergée dans du méthanol pendant 10 min, rincée avec de l'eau ultra-pure sous agitation pendant 1 h et puis séchée à l'étuve pendant 24 h à 100 °C.

b. Etape d'adsorption

L'étape d'adsorption se déroule par une mise en contact de 50 mg d'adsorbant avec 10 mL de la solution contenant les acides hydroxycinnamiques, sous agitation et à température ambiante (24°C ± 2°C). L'effet du pH de la solution sur l'adsorption a été étudié par l'ajout de soude ou de HCl. L'évolution de la concentration en acides au cours du temps dans la phase liquide, a été étudiée par l'analyse de prélèvements de 200 µL effectués régulièrement pendant 24 h.

c. Etape de désorption

Le solide a été séparé du mélange et séché à l'étuve à 60 °C pendant 24 h. Ensuite, 2 mL d'éthanol 70 % (ou 96 %) ont été ajoutés. Le mélange a été placé dans un thermomixer à 1 300 rpm pendant 3 h et à 60 °C puis analysés par HPLC.













d. Etape de régénération










Après désorption, les zéolithes et la résine sont conditionnées selon le protocole décrit dans le paragraphe 4.a et réutilisées selon le protocole décrit en 4.b.

5. Références bibliographiques

- AOAC. 1990. "Official Methods of Analysis. 15th Edn." *Association of Official Analytical Chemist* Washington DC, Etats-Unis.
- Baerlocher, Christian, WM Meier, DH Olson. 2001. "Atlas of Zeolite Framework Types. Published on Behalf of the Structure Commission of the International Zeolite Association."
- Bauer, Jonas Lewin, Britta Harbaum-Piayda, Karin Schwarz. 2012. "Phenolic Compounds from Hydrolyzed and Extracted Fiber-Rich by-Products." *LWT-Food Science and Technology* 47 (2): 246–54.
- Blumenkrantz, Nelly, Gustav Asboe-Hansen. 1973. "New Method for Quantitative Determination of Uronic Acids." *Analytical Biochemistry* 54 (2): 484–89.
- Chaffey, Nigel. 2002. "Wood Microscopical Techniques." *Wood Formation in Trees. Cell and Molecular Biology Techniques*, 17–40.
- Choudhury, Gour S, Binoy K Gogoi, Aaron J Oswalt. 1998. "Twin-Screw Extrusion Pink Salmon Muscle and Rice Flour Blends: Effects of Kneading Elements." *Journal of Aquatic Food Product Technology* 7 (2): 69–91.
- Evon, Philippe, Virginie Vandenbossche, Pierre-Yves Pontalier, Luc Rigal. 2010. "La Technologie D'extrusion Bi-Vis, Une Solution Originale et Performante Pour Le Bioraffinage Du Tournesol Plante Entière." *Oléagineux, Corps Gras, Lipides* 17 (6): 404–17.
- Gautam, Akhilesh, Gour S Choudhury. 1999. "Screw configuration effects on residence time distribution and mixing in twin-screw extruders during extrusion of rice flour." *Journal of Food Process Engineering* 22 (4): 263–85.
- Gogoi, Binoy K, Gour S Choudhury, Aaron J Oswalt. 1996. "Effects of Location and Spacing of Reverse Screw and Kneading Element Combination during Twin-Screw Extrusion of Starchy and Proteinaceous Blends." *Food Research International* 29 (5): 505–12.
- Jensen, William A William A. 1962. "Botanical Histochemistry: Principles and Practice."
- Locquin, Marcel, Maurice Langeron. 1978. *Manuel de Microscopie*. Paris.: Masson.
- Rigal, L. 1996. "Twin-Screw Extrusion Technology and Fractionation of Vegetable Matter." *ENSC, Toulouse, France*.
- Singleton, VL, Joseph A Rossi. 1965. "Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents." *American Journal of Enology and Viticulture* 16 (3): 144–58.
- Tilay, Ashwini, Mahesh Bule, Jyoti Kishenkumar, Uday Annapure. 2008. "Preparation of Ferulic Acid from Agricultural Wastes: Its Improved Extraction and Purification." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (17): 7644–48.
- Tranchant, J. 1995. "Manuel Pratique de Chromatographie En Phase Gazeuse, 4 E Édition, 1995," 362.
- Van Soest, PJ, RH Wine. 1967. "Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feeds. IV. Determination of Plant Cell-Wall Constituents." *J Assn Offic Anal Chem* 50: 50–55.

*Annexes***Annexe 1 : Cycle de développement de la plante (Terres Inovia 2015)**

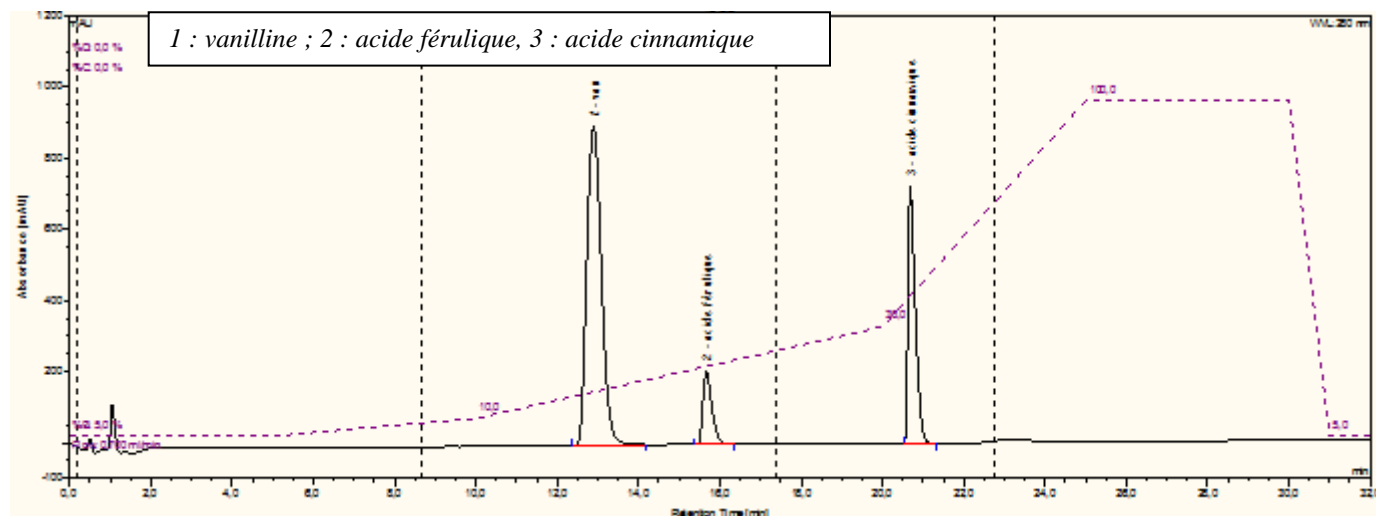
Stade	Nbre de jours depuis le semis	Période de l'année		
Semis 	0	début avril à début mai		
Levée 	0 à 9 jours	mi- avril à mi- mai		
Implantation 	9 jours à 3 semaines	avril/ mai		
Croissance active 	3 semaines à 3 mois	mai à fin juillet		

<p>Début floraison</p> 	<p>+ /- 1 semaine</p>	<p>fin juillet à début août</p>		
<p>Pleine / fin floraison</p> 	<p>+/- 2 semaines</p>	<p>mi- août à fin août</p>		
<p>Maturité / récolte</p> 		<p>fin août à fin septembre selon le mode de culture</p>		
<p>Total</p>	<p>= 120 à 150 jours</p>			

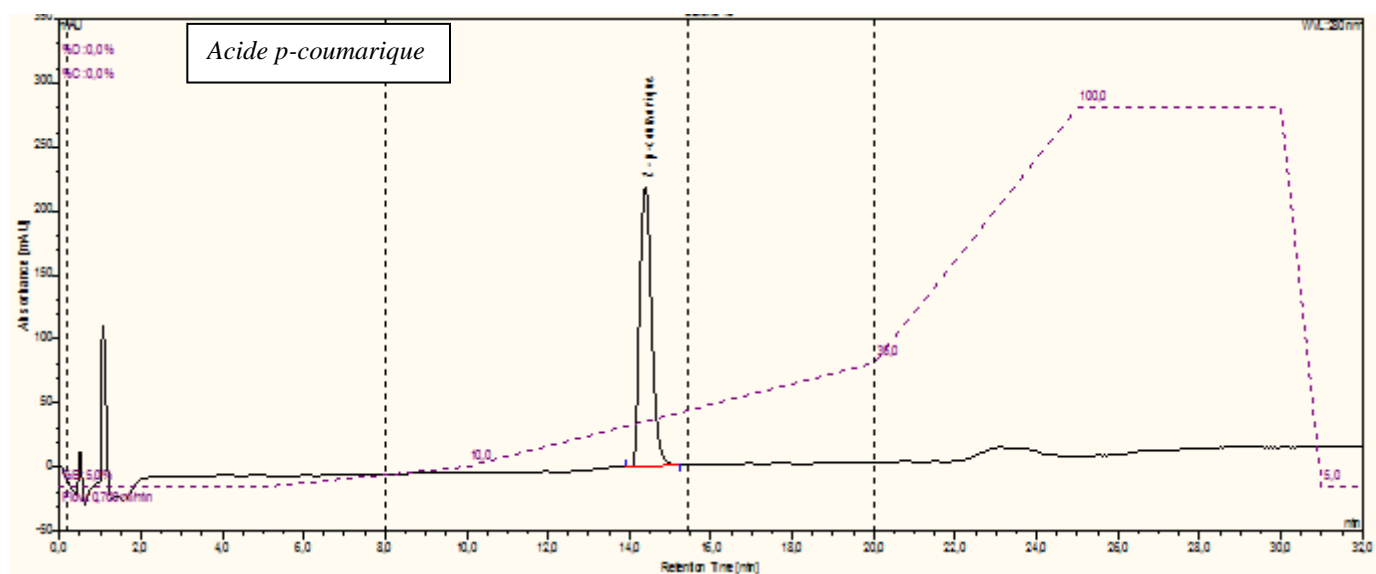
Annexe 2 : Propriétés physico-chimiques des composés phénoliques étudiés

	Acide Cinnamique	Acide <i>p</i> -Coumarique	Acide Férulique	Vanilline
Formule brute	C₉H₈O₂	C₉H₈O₃	C₁₀H₁₀O₄	C₈H₈O₃
Masse Molaire	148,16 g.mol⁻¹	164,15 g.mol⁻¹	194,18 g.mol⁻¹	152,14 g.mol⁻¹
pKa	4,40	4,64	4,58	7,40
pKa OH	8 < pKa OH < 11			
Solubilité (25 °C)	0,5 g.L⁻¹	0,8 g.L⁻¹	0,8 g.L⁻¹	10 g.L⁻¹
Précautions	Irritant R36/37/38	Irritant R36/37/38 et S25/26	Irritant R36/37/38	R22 et S25/26
Toxicité (DL50)	2500 mg.kg⁻¹		857 mg.kg⁻¹	1 580 mg.kg⁻¹

Annexe 3 : Exemples de chromatogrammes de solutions étalons obtenus en HPLC



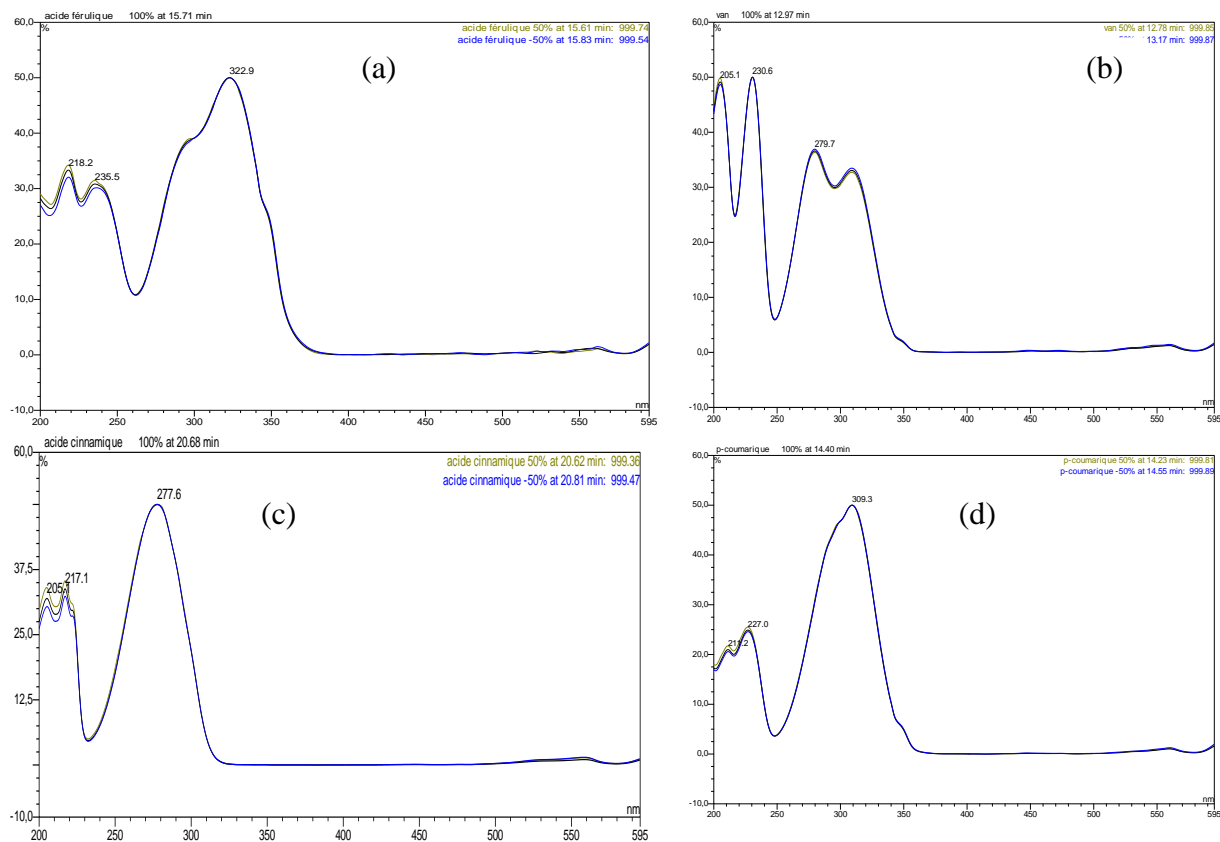
Solution étalon contenant 492mg/L de vanilline, 99 mg/L d'acide férulique et 100 mg/L d'acide cinnamique, analysée en HPLC à 280 nm



Solution étalon contenant 500 mg/L d'acide p-coumarique analysée en HPLC à 280 nm

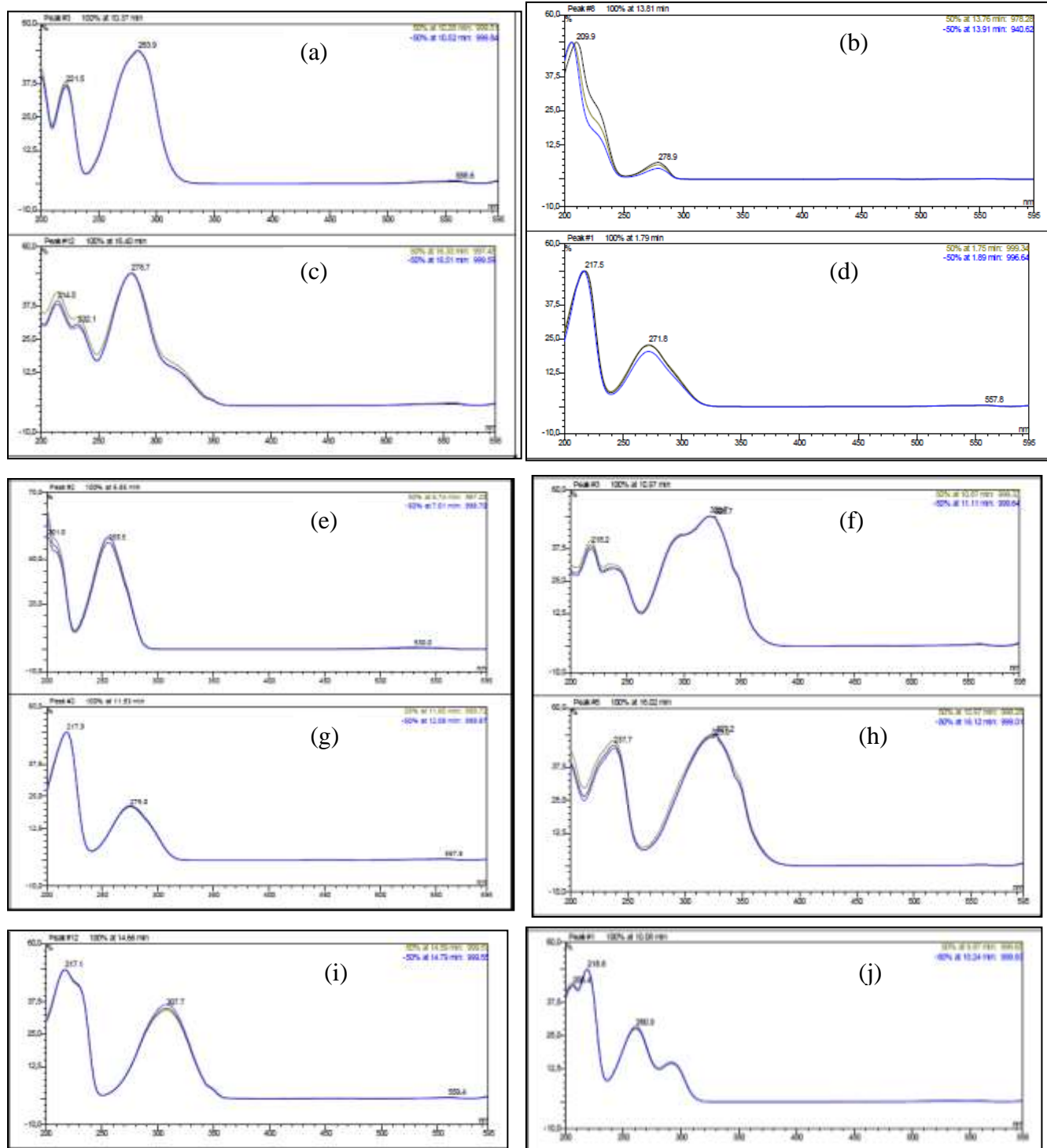
Annexe 4 : Spectres UV d'acides hydroxycinnamiques et d'acides phénoliques obtenus par injection de solutions étalons en HPLC

a. Composés ciblés



(a) : Acide férulique, $\lambda_{max} = 322,9 \text{ nm}$; (b) : Vanilline, $\lambda_{max} = 279,7 \text{ nm}$; (c), Acide cinnamique, $\lambda_{max} = 277,6 \text{ nm}$; (d) : Acide p-coumarique, $\lambda_{max} = 309,3 \text{ nm}$

b. Autres composés



(a) : 4-hydroxybenzaldéhyde, λ_{max} = 221,5-283,9 nm ; (b) : (-) epicatechine, λ_{max} = 209,9-278,9 nm ; (c) : Acide *m*-coumarique, λ_{max} = 214,5-232,1-278,7 ; (d) : Acide gallique, λ_{max} = 217,5-271,8 ; (e) : Acide 4-hydroxybenzoïque, λ_{max} = 201,0-255,5 ; (f) : Acide caféique, λ_{max} = 218,2-322,7 ; (g) : Acide syringique, λ_{max} = 217,9-275,0 ; (h) : Acide sinaprique, λ_{max} = 237,7-323,0 ; (i) : Syringaldéhyde, λ_{max} = 217,2-307,8 ; (j) : Acide vanillique, λ_{max} = 206,4-218,8-260,9

Annexe 5 : Réactifs et solvants utilisés dans notre étude

Produit	Pureté	Numero CAS	Fournisseur
Acide <i>trans</i> -férulique	≥99%	537-98-4	Sigma-Aldrich
Acide coumarique	≥98%	501-98-4	Sigma-Aldrich
Acide <i>trans</i> -cinnamique	≥99%	140-10-3	Sigma-Aldrich
Vanilline	99%	148-53-8	Acros organics
NaOH	97%	1310-73-2	VWR Chemicals BDH Prolabo
Acide chlorhydrique HCL	37%	7647-01-0	Fisher scientific
Acide phosphorique	≥ 87%	7664-38-2	Sigma-Aldrich
Acide gallique	≥98%	149-91-7	Sigma-Aldrich
Eau	Eau milli-Q		-
Acétonitile	Grade HPLC	75-05-8	Merck
Méthanol	Grade HPLC	67-56-1	Merck
Toluène	Grade HPLC	108-88-3	Sigma-Aldrich
Ethanol	≥ 99,8%	64-17-5	Sigma-Aldrich
Dioxane	99,8%	123-91-1	Sigma-Aldrich
Isopropanol	99,8%	67-63-0	Sigma-Aldrich
Acétate de sodium	99,0%	127-09-3	Sigma-Aldrich
Phosphate disodique	≥ 99%	7558-79-4	Merck
Laurylsulfate de sodium	> 99%	151-21-3	Merck
EDTA	≥ 99,5%	60-00-4	Sigma-Aldrich
Borate de sodium décahydraté	> 97%	1303-96-4	Fluka
CTAB	≥ 98%	57-09-0	Sigma-Aldrich
Acide sulfurique	95,0-97,0%	7664-93-9	Sigma-Aldrich
Permanganate de potassium	≥ 99,0%	7722-64-7	Sigma-Aldrich
Fe(NO ₃) ₃ 9H ₂ O	> 99%	7782-61-8	Acros

AgNO ₃	≥ 99%	7761-88-8	Sigma-Aldrich
Acide acétique glacial	≥ 99,8%	64-19-7	Sigma-Aldrich
Acétate de potassium	≥ 99,0%	127-08-2	Riedel- de Haën
Alcool butylique tertiaire	≥ 99%	71-36-3	Sigma-Aldrich
Acide oxalique dihydraté	≥ 99%	144-62-7	Sigma-Aldrich
CuSO ₄	98%	7758-98-7	Sigma-Aldrich
Acide borique	100%	10043-35-3	VWR Chemicals BDH Prolabo
Vert de bromocrésol	100%	76-60-8	Acros
Rouge de méthyle	100%	493-52-7	Janssen chemical
Acide galacturonique	100%	91510-62-2	Sigma-Aldrich
Tétraborate de sodium	≥ 99,5%	1330-43-4	Sigma-Aldrich
Cyclohexane	≥ 99,7%	110-82-7	Sigma-Aldrich
Réactif de Folin-Ciocalteu	2N	-	Sigma-Aldrich
Carbonate de sodium anhydre	≥ 99,9%	497-19-8	VWR Chemicals BDH Prolabo

Annexe 6 : Production scientifique au cours de la thèse

a. Publication

V. Simon, A. Thuret, L. Candy, **S. Bassil**, S. Duthen, C. Raynaud, A. Masseron, Recovery of hydroxycinnamic acids from renewable resources by adsorption on zeolites, *Chemical Engineering Journal*, 280, 748-754, 2015

b. Conférences internationales avec actes

S. Bassil, L. Candy, V. Simon, C. Raynaud, Extraction of bioactive compounds using twin-screw extrusion: comparison of two hemp byproducts, *10th International conference on Renewable Ressources and Biorefineries, RRB10*, Valladolid, Espagne, 04-06 juin 2014.

S. Bassil, L. Candy, S. Duthen, V. Simon, C. Raynaud, Microwave assisted extraction of hydroxycinnamic acids from industrial hemp dust, *3rd International conference, Wastes : Solutions, Treatments and Opportunities*, Viana do Castelo, Portugal, 14-16 septembre 2015

c. Posters

S. Bassil, L. Candy, A. Thuret, A. Masseron, V. Simon, C. Raynaud, Valorisation de Cannabis sativa L. pour l'obtention de monomères aromatiques à haute valeur ajoutée, *Séminaire Bioraffinerie des lignocelluloses- BILI*, Paris, France, 14 et 15 mai 2013.

A. Kandji, A. Thuret, **S. Bassil**, L. Candy, C. Raynaud, V. Simon, A. Masseron, Zeolite adsorbents of phenolic compounds extracted from renewable resources, *30ème Réunion du Groupe Français des Zéolithes, GFZ 2014*, Ile de Ré, 19-21 mars 2014

A. Kandji, A. Thuret, **S. Bassil**, L. Candy, C. Raynaud, V. Simon, A. Masseron, utilisation de zéolithes pour l'adsorption de composés phénoliques issus de la biomasse, *Matériaux 2014*, Montpellier, France, 24-28 novembre 2014

RÉSUMÉ

LES PROCÉDES INDUSTRIELS DE TRANSFORMATION DES GRANDES PRODUCTIONS VÉGÉTALES GÉNÈRENT DES QUANTITÉS IMPORTANTES DE COPRODUITS QUI PEUVENT TRÈS SOUVENT TROUVER UNE VALORISATION EN TANT QUE SOURCES DE MOLECULES À VALEUR AJOUTÉE POUR L'AGROCHIMIE. LES TRAVAUX DE THÈSE SE POLARISENT SUR UNE MATIÈRE PREMIÈRE ORIGINALE : LE CHANVRE (*CANNABIS SATIVA* L.), PLANTE RICHE EN UNE LIGNINE PARTICULIÈRE, DE CARACTÉRISTIQUES DIFFÉRENTES DE CELLE DU BOIS ET BEAUCOUP PLUS ACCESSIBLE.

LE PROCÉDE DE DEFIBRAGE DU CHANVRE (*CANNABIS SATIVA* L.) GÉNÈRE 30% DE FIBRES POUR 70% DE COPRODUITS LIGNOCELLULOSIQUES : CHENEVOTTE (50%) ET POUDRE ORGANIQUE (20%) LESQUELS ONT ÉTÉ ÉTUDIÉS ICI COMME SOURCES POTENTIELLES D'ACIDES HYDROXYCINNAMIQUES (AHC) TELS QUE LES ACIDES FERULIQUE (AF) ET *P*-COUMARIQUE (APC). LEUR RÉPARTITION STRUCTURALE DANS LA MATRICE LIGNOCELLULOSIQUE A ÉTÉ ÉVALUÉE ANALYTIQUEMENT PAR HYDROLYSES SÉQUENCÉES. L'AF EST MAJORITAIREMENT ÉTHERIFIÉ À LA STRUCTURE LIGNOCELLULOSIQUE, ET CE POUR LES DEUX MATIÈRES, TANDIS QUE L'APC EST PRINCIPALEMENT SOUS FORME ESTÉRIFIÉE DANS LA POUDRE ORGANIQUE ET LIE EN PROPORTIONS ÉQUIVALENTES PAR DES LIAISONS ESTER ET ÉTHER DANS LA CHENEVOTTE.

LE FRACTIONNEMENT DES COPRODUITS DU CHANVRE POUR L'OBTENTION D'EXTRAITS ET RAFFINATS PERFORMANTS EN ACIDES PHÉNOLIQUES A ÉTÉ ÉTUDIÉ PAR EXTRACTION ASSISTÉE PAR MICRO-ONDES ET EXTRACTION THERMO-MÉCANO-CHIMIQUE EN EXTRUDEUR BI-VIS. CES MÉTHODES ONT TOUTES DEUX PERMIS D'INTENSIFIER L'EXTRACTION DES AHC. POUR LA CHENEVOTTE, UN SOLVANT HYDRO-ALCOOLIQUE ALCALIN CONDUIT AUX RENDEMENTS OPTIMAUX EN APC EN RÉACTEUR MICRO-ONDES ET EN AF PAR EXTRUSION BI-VIS TANDIS QUE, POUR LA POUDRE ORGANIQUE, CE MÊME SOLVANT EST LE PLUS EFFICACE POUR EXTRAIRE LES DEUX ACIDES PHÉNOLIQUES PAR EXTRUSION BI-VIS.

L'ENRICHISSEMENT EN AHC DES EXTRAITS PAR ADSORPTION SUR DIFFÉRENTS SOLIDES MICROPOREUX A ÉTÉ ÉTUDIÉ. LA ZEOLITE *BEA (BETA) A DÉMONTRÉ UN FORT POTENTIEL TANT POUR L'ADSORPTION D'AHC DE SOLUTIONS MODÈLES QUE POUR CEUX CONTENUS DANS LES EXTRAITS ISSUS DES SCHEMAS DE FRACTIONNEMENT.

ABSTRACT

THE INDUSTRIAL TRANSFORMATION OF COMMON CULTIVATED CROPS GENERATES SIGNIFICANT AMOUNTS OF BY-PRODUCTS THAT CAN OFTEN BE VALORIZED AS A SOURCE OF VALUE-ADDED MOLECULES FOR BIOCHEMISTRY. THE PRESENT WORK FOCUSES ON AN ORIGINAL RAW MATERIAL: HEMP (*CANNABIS SATIVA* L.), RICH IN A PARTICULARLY, MORE ACCESSIBLE, LIGNIN HAVING DIFFERENT CHARACTERISTICS THAN THAT OF WOOD.

HEMP DEFIBERING PROCESS (*CANNABIS SATIVA* L.) GENERATES 30% FIBERS AND 70% LIGNOCELLULOSIC BY-PRODUCTS: HEMP SHIVES (50%) AND HEMP DUST (20%) WHICH WERE STUDIED IN THIS WORK AS A POTENTIAL SOURCE OF HYDROXYCINNAMIC ACIDS (HCA) SUCH AS FERULIC (FA) AND *P*-COUMARIC (PCA) ACIDS. THEIR STRUCTURAL DISTRIBUTION IN THE LIGNOCELLULOSIC MATRIX WAS ANALYTICALLY EVALUATED BY MULTISTAGE HYDROLYSIS. FA IS MOSTLY ETHERIFIED TO THE LIGNOCELLULOSIC STRUCTURE, WHILE PCA IS MAINLY ESTERIFIED IN HEMP DUST AND EQUALLY BOUND THROUGH ESTER AND ETHER LINKAGES IN HEMP SHIVES.

BIOREFINERY OF HEMP BY-PRODUCTS, TO OBTAIN EXTRACTS AND RAFFINATES WHICH ARE RICH IN PHENOLIC ACIDS, WAS STUDIED BY USING MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION AND THERMO-MECHANOCHEMICAL EXTRACTION USING TWIN-SCREW EXTRUDER. BOTH METHODS HAVE HELPED TO INTENSIFY THE EXTRACTION OF HCA. FOR HEMP SHIVES, ALKALINE-HYDRO ALCOHOLIC SOLVENT LEAD TO THE OPTIMUM YIELDS OF PCA BY MICROWAVE EXTRACTION AND OF FA BY TWIN-SCREW EXTRUSION, WHILE FOR HEMP DUST, THE SAME SOLVENT IS THE MOST EFFECTIVE FOR THE EXTRACTION OF BOTH PHENOLIC ACIDS USING TWIN-SCREW EXTRACTION.

THE ENRICHMENT OF HCA EXTRACTS BY ADSORPTION ON DIFFERENT MICROPOROUS SOLIDS HAS BEEN INVESTIGATED. THE ZEOLITE *BEA (BETA) SHOWED A HIGH POTENTIAL OF HCA ADSORPTION FROM BOTH MODEL SOLUTIONS AND EXTRACTS OBTAINED FROM FRACTIONATION.